

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BRUNA SANTANA SILVA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO DANO HEPÁTICO CAUSADO POR FLAVIVIROSES
ASSOCIADAS OU NÃO À DIABETES *MELITTUS***

BRUNA SANTANA SILVA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO DANO HEPÁTICO CAUSADO POR FLAVIVIROSES
ASSOCIADAS OU NÃO À DIABETES MELLITUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Investigativa” (Linha de Pesquisa: Estudos em modelos experimentais de doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 08 de fevereiro de 2024

Banca Examinadora:

Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias - Coorientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Glauca Eloisa Munhoz de Lion Siervo
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Gabriel Henrique Campolina Silva
Université Laval

**FEVEREIRO
2024**





Externo, em 09/02/2024, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **GLAUCIA ELOISA MUNHOZ DE LION SIERVO, Professor do Magistério Superior**, em 09/02/2024, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Henrique Campolina Silva, Usuário Externo**, em 15/02/2024, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1189274** e o código CRC **C82EAB29**.

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

P718a	<p>Pinheiro, Bruna Santana Silva Avaliação do dano hepático causado por flavivírus associadas ou não à Diabetes Mellitus / Bruna Santana Silva Pinheiro. -- 2024. 73 f.: il., fig., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024 Orientador: Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes Coorientadora: Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias</p> <p>1. Fígado. 2. Flavivirus. 3. Zika virus. 4. Diabetes Mellitus. I. Gomes, Marcos de Lucca Moreira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.36</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de dissertação a minha família que tanto fez e faz por mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao apoio, paciência e compreensão na construção e desenvolvimentos destes projetos à Marcos de Lucca, Fernanda Dias, Julia Gonçalves, Aline da Silva, Bruna Cunha, Maria Laura, LIC (Laboratório de Interações Celulares), CAPES e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFTM.

SUMÁRIO

1 1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A MORFOLOGIA HEPÁTICA.....	15
1.2 DIABETES.....	15
1.3 OS FLAVIVÍRUS.....	16
1.4 O VÍRUS ZIKA.....	17
1.5 EFEITOS HEPÁTICOS DEVIDO À INFECÇÃO COM ZIKA VÍRUS.....	18
2 JUSTIFICATIVA	18
3 HIPÓTESE	19
A infecção com ZIKV leva a danos ao parênquima hepático e este dano é potencializado pela diabetes.	19
4 OBJETIVOS	19
4.1 GERAL.....	19
4.2 ESPECÍFICOS.....	19
CAPÍTULO 1	21
Danos hepáticos causados por flavivíroses: uma revisão sistemática.....	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 METODOLOGIA	23
2.1 Estratégia de busca e questão de pesquisa.....	23
2.2 Seleção de estudos.....	24
2.3 Risco de viés.....	25
3 RESULTADOS	25
3.1. O processo de revisão.....	25
3.2. Características virais.....	27
3.3. Alterações hepáticas.....	23
3 DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÃO	31
6 REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2	37
Desregulação funcional, oxidativa e estrutural hepática causada pela associação da hiperglicemia com a infecção por ZIKV em camundongos BALB/c.....	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1. Animais e caracterização do biotério.....	39
2.2. Grupos experimentais.....	39

2.3. Indução do diabetes.....	39
2.4. Imunodepressão farmacológica.....	40
2.5. Infecção pelo vírus Zika.....	40
2.6. Coleta de órgãos.....	40
2.7. Biometria corporal e hepática.....	41
2.8. Estresse oxidativo.....	41
2.9. Análise de danos ao fígado.....	42
2.10. Quantificação bioquímica.....	42
2.11. Definição de titulação viral em amostras de soro.....	42
2.12. ZIKV RT – qPCR – Detecção do Zika vírus.....	43
2.15. Análises estatísticas.....	44
3 RESULTADOS	44
3.1 Biometria corporal e hepática.....	44
3.2 Estresse oxidativo.....	46
3.3 Análise de danos ao fígado.....	48
3.4 Glicemia.....	48
3.5 Albumina.....	49
3.6 Colesterol.....	49
3.7 Gama GT.....	50
3.8 Fosfatase alcalina.....	50
3.9 LDH.....	51
3.10 Lactato.....	51
3.11 Morfologia e morfometria hepáticas.....	51
3.12 Glicogênio hepático.....	55
3.13 Atividade viral.....	57
3.14 Análise de componente principal.....	58
4. DISCUSSÃO	59
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS	66
Tabela Suplementar 1: Comparação entre o grupo controle não infectado e não diabético com um grupo imunossuprimido (apenas recebeu a dexametasona).....	75
7 ANEXOS	76
7.1 Anexo 1.....	76
7.2 Artigo publicado.....	77

RESUMO

Os flavivírus representam um desafio significativo para a saúde global, pois têm a capacidade de infectar artrópodes e causar variados danos no organismo humano. Dentre eles, o arbovírus chamado Zika (ZIKV), descoberto no ano de 1947 na África, veio a ter seu primeiro caso confirmado no Brasil no ano de 2015 e em razão ao grande número de vetores existentes se dissipou rapidamente. O ZIKV vem sendo estudado de forma mais relevante desde que foi identificado como causa de microcefalia e outros processos neurológicos em recém-nascidos. Além disso, danos hepáticos também foram relatados em associação à infecção do Zika e de outras flaviviroses estudadas nessa pesquisa, como a dengue e a febre amarela. Estudos evidenciam perda celular causada pela citotoxicidade devido à infecção viral nos hepatócitos após infecção com ZIKV o que também é observado em hepatites virais. Nas infecções virais agudas, indivíduos com doenças crônicas pré-existentes, como diabetes mellitus, são mais propensos a desenvolver quadros mais graves. O diabetes tem, também, importante papel na iniciação e progressão de lesões hepáticas. Com isso, este estudo avaliou os efeitos da associação do diabetes mellitus e a infecção com ZIKV sobre o parênquima hepático de camundongos Balb/c machos em uma pesquisa experimental e os danos hepáticos causados por flaviviroses em uma revisão sistemática. A indução da diabetes foi feita com estreptozotocina diluída em tampão citrato de sódio, a infecção foi feita após imunossupressão com dexametasona e o vírus foi inoculado por via intraperitoneal em meio RPMI. Os veículos utilizados para diluição foram administrados nos controles para simulação do estresse. Em 28 dias os animais de cada grupo foram eutanasiados. O fígado foi coletado, pesado e processado para análises de morfometria, histopatologia, estresse oxidativo e análise de danos hepáticos. Foram encontradas alterações nas atividades das enzimas antioxidantes CAT no grupo zika, proteína carbonilada e FRAP nos grupos zika, diabético e diabético com zika, elevação de ALT e AST nos grupos diabético e diabético com zika, elevação de glicemia, níveis de lactato, além de alterações morfológicas com morte celular e degeneração hidrópica em todos os grupos. Com isso, conclui-se que o diabetes prolonga a atividade da viremia do zika e que existe um impacto negativo na funcionalidade hepática pelo zika vírus e diabetes.

Palavras-chave: Zika vírus, diabetes, hepatotoxicidade, fígado.

ABSTRACT

Flaviviruses pose a significant challenge to global health, as they have the ability to infect arthropods and cause various damages to the human body. Among them, the arbovirus known as Zika (ZIKV) was discovered in 1947 in Africa, had its first confirmed case in Brazil, it was introduced in 2015, and due to the large number of existing vectors, it quickly dissipated. ZIKV has been studied in a more relevant way since it was identified as a cause of microcephaly and other neurological processes in newborns. Furthermore, liver damage has also been reported in association with the infection and Other flaviviruses studied in this research, as dengue and yellow fever. Studies show cell loss caused by cytotoxicity due to viral infection in hepatocytes after infection with ZIKV, which is also observed in viral hepatitis. In acute viral infections, individuals with pre-existing chronic diseases, such as diabetes mellitus, are more likely to develop more serious conditions. Diabetes also plays an important role in the initiation and progression of liver damage. Therefore, this study evaluated the effects of the association of diabetes mellitus and ZIKV infection on the liver parenchyma of male BALB/c mice in an experimental research and the hepatic damage caused by flaviviruses in a systematic review. Diabetes was induced with streptozotocin diluted in sodium citrate buffer. Infection was performed after immunosuppression with dexamethasone and the virus was inoculated intraperitoneally in RPMI medium. The vehicles used for dilution were administered to controls to simulate stress. In 28 days, the animals in each group were euthanized. The liver was collected, weighed and processed for morphometry, histopathology, oxidative stress and liver damage analysis. Changes were found in the activities of the antioxidant enzymes CAT in the Zika group, carbonyl protein and FRAP in the Zika, diabetic and diabetic groups with Zika, elevation of ALT and AST in the diabetic and diabetic groups with Zika, elevation of glycemia, lactate levels, in addition to morphological changes with cell death and hydropic degeneration in all groups. Therefore, diabetes prolongs the activity of Zika viremia and that there is a negative impact on liver functionality caused by the Zika virus and diabetes.

Keywords: Zika virus, diabetes, liver toxicity, liver.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MORFOLOGIA HEPÁTICA

No ser humano, o fígado é um órgão essencial que se localiza no quadrante superior direito do abdome e pesa aproximadamente 1,5 kg em um indivíduo adulto saudável. Sua ação é crucial para diversos processos fisiológicos, como: metabolismo de macronutrientes, suporte do sistema imunológico, regulação do volume sanguíneo, homeostase de lipídios e colesterol e degradação de xenobióticos. No ser humano é dividido em quatro lobos e seu aporte sanguíneo ocorre via veias porta, hepática e cava inferior, além da artéria hepática (KUMAR et al., 2018).

O fígado é composto por diferentes tipos celulares, principalmente hepatócitos (que constituem a maior parte do volume do fígado e realizam sua função metabólica), células epiteliais biliares (colangiócitos - segunda maior população epitelial do fígado e possui função epitelial de revestimento), células estreladas (atuam na deposição e organização do colágeno) e células de Küpffer (possuem função fagocitária), além de células comumente encontradas no tecido conjuntivo propriamente dito, como fibroblastos. Por serem células de tipos diferentes, possuem também distintas funções, regulando em conjunto a função hepática. As células estreladas são ativadas quando ocorrem danos ao fígado e por conseguinte, atuam na deposição e organização do colágeno para reparar tais lesões. Este processo de cura do fígado ocorre a partir da cicatrização deste e, à medida que este ciclo se repete, pode ocorrer a evolução para o quadro de cirrose, gerando insuficiência hepática (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2018).

O fígado também atua no armazenamento da glicose na forma de glicogênio em seus hepatócitos, junto às enzimas responsáveis pela sua hidrólise. O glicogênio hepático tem como função manter a glicemia do corpo em níveis desejáveis em períodos de jejum entre as refeições (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2018).

1.2 DIABETES

A supernutrição tem trazido preocupações devido ao seu efeito sobre a resistência à insulina no fígado, que demonstra correlação positiva com o diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e com a síndrome metabólica. A resistência hepática à insulina é descrita pela perda da capacidade da insulina de inibir a glicogenólise no fígado, contribuindo para o aumento da glicemia, mas ainda mantendo seu efeito

estimulador na lipogênese (BECHMANN et al., 2012; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2018).

Nessa perspectiva, destaca-se que um importante problema de saúde pública é o diabetes mellitus (DM), doença que afeta 1 a cada 10 pessoas (entre 20 a 79 anos de idade) no mundo, segundo a Federação Internacional de Diabetes (2021). A DM é reiteradamente associada à obesidade e possui como característica tanto a resistência à insulina quanto queda em sua produção. A resistência à insulina (RI) é a marca fisiopatológica da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma das causas mais comuns de doença hepática crônica, isso muitas vezes ocorre porque a RI gera aumento do fluxo de ácidos graxos livres leva ao acúmulo de triglicerídeos hepáticos e contribui para o comprometimento do metabolismo da glicose e da sensibilidade à insulina no fígado (BUGIANESI; MCCULLOUGH; MARCHESINI, 2005). Já o aumento da produção de glicose hepática provocada pelos níveis de insulina relativamente baixos, associado à resistência hepática à insulina, pode resultar em episódios de hiperglicemia.

Existe prevalência do quadro de diabetes em pacientes com doenças hepáticas crônicas, hepatite, cirrose, entre outras. Assim, sugere-se que o diabetes tem um papel importante na iniciação e progressão da lesão hepática (HICKMAN; MACDONALD, 2007). O *National Health and Nutrition Examination Survey* identificou risco 3 vezes maior do diabetes em indivíduos com mais de 40 anos e que tinham o vírus da hepatite C (HCV) crônico, em comparação a participantes negativos para HCV. Essa relação entre as duas deve-se ao fato de que genótipos específicos de HCV são associados à resistência à insulina (HUI et al., 2003) inibindo a sinalização de insulina. O impacto do diabetes em pessoas com HCV está associado a Hiperinsulinemia (HICKMAN et al., 2003) hiperglicemia (RATZIU; TRABUT; POYNARD, 2004) e resistência à insulina (TAURA et al., 2006) causando fibrose severa.

1.3 OS FLAVIVÍRUS

Os *Flavivirus* são caracterizados como vírus da família *Flaviviridae*, icosaédricos, cuja estrutura é envelopada com um genoma de RNA positivo de fita simples e sua replicação ocorre no citoplasma da célula hospedeira (ZHANG et al., 2003). Devido à sua habilidade de infectar artrópodes e mamíferos, suas doenças são entendidas como um considerável problema de saúde global, infectando até 400 milhões de pessoas por ano (PIERSON; DIAMOND, 2018). Os artrópodes, em especial carrapatos e mosquitos,

atuam como vetores de flavivírus e são encontrados comumente em regiões tropicais super povoadas, facilitando o risco de infecção por grande parte da população mundial (DAEP; MUÑOZ-JORDÁN; EUGENIN, 2014).

Entre as flavivirose mais conhecidas estão zika (ZIKV), dengue (DENV), febre amarela (YFV) e hepatite C (HCV). Com exceção da HCV, que tem como meio de contaminação apenas o contato com secreção e fluido corporal (MANSO et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018), todas as outras são principalmente transmitidas por mosquitos. Diante disso, há grande dificuldade na execução do controle vetorial, visto que são artrópodes muito bem adaptados, o que favorece sua sobrevivência (GEERLING et al., 2020). A maioria dessas viroses apresenta manifestações assintomáticas ou com sintomas brandos, tais quais vômitos, febre, dor de cabeça e mal-estar; demonstrando a importância do conhecimento de seus possíveis efeitos tóxicos para prevenção de um agravo silencioso. Todavia, também são relatados casos mais graves como hemorragia, choque, encefalite, meningite, síndrome congênita do ZIKV, falência renal e hepática (VAN LEUR et al., 2021). Tais ocorrências ratificam ainda mais a necessidade de estudos sobre esses vírus, sobretudo sobre seu efeito hepático, já que é sabido que hepatócitos são permissíveis à replicação viral e o fígado é de suma importância para manutenção da homeostase corporal (SHERMAN et al., 2019a).

1.4 O VÍRUS ZIKA

ZIKV é um *Flavivirus* de ácido ribonucleico de fita simples (RNA) da família *Flaviviridae*, e sua transmissão ocorre principalmente por intermédio da picada do mosquito fêmea do gênero *Aedes*, já que são um tipo de arbovírus de RNA e os humanos são hospedeiros eventuais. Ainda não há grande esclarecimento quanto à patogênese do ZIKV, entretanto, acredita-se que se espalhe próximo aos gânglios linfáticos e em seguida na circulação sistêmica (PERGOLIZZI et al., 2021).

A epidemiologia do Zika vírus foi pouco estudado até o ano de 2007 por apresentar poucas infecções e sintomas brandos que incluem náuseas, dor abdominal, diarreia e outros. Entretanto, neste mesmo ano ocorreu a infecção de três quartos dos habitantes das Ilhas Yap na Micronésia, e em 2013, foram relatados diversos casos de contaminação em países como o Japão, Noruega e França (DUFFY et al., 2009; FAYE et al., 2014). Já no ano de 2015, foram noticiados os primeiros casos de ZIKV no Brasil na cidade de Natal do estado do Rio Grande do Norte (WHO, 2016).

A propagação facilitada deste e de outros vírus deve-se à rápida globalização ocorrida nas últimas décadas, inclusive especulando-se que o vírus ZIKV tenha se introduzido no Brasil durante os jogos da copa do mundo em 2014 (SALVADOR; FUJITA, 2016). Dentre as consequências da contaminação pelo ZIKV estão o aborto precoce ou mal formação do feto em diferentes níveis de gravidade, sendo possível até o desenvolvimento de deficiência visual, auditiva e microcefalia no bebê (BRASIL, 2016).

1.5 EFEITOS HEPÁTICOS DEVIDO À INFECÇÃO COM ZIKA VÍRUS

Devido às consequências devastantes da microcefalia em fetos causada pelo ZIKV, o desenvolvimento neural tem sido o principal foco dos estudos, existindo poucos dados sobre o efeito da infecção em outros sistemas (CHAN et al., 2016)(ZHANG et al., 2017). A África central e ocidental foram os primeiros lugares a relatar a infecção pelo ZIKV associado ao desenvolvimento de insuficiência hepática e icterícia. Estudos *in vitro* apontam que os hepatócitos são permissíveis a replicação viral (SHERMAN et al., 2019b). A citotoxicidade direta ou por mecanismos de depuração imunomediados pode ser causada por flavivírus, visto que possuem a capacidade de infectar os hepatócitos (MACNAMARA, 1954).

A citotoxicidade causa morte celular significativa devido à infecção viral nos hepatócitos 3 dias pós infecção com ZIKV. Tal perda celular limita a produção do vírus e este padrão de citotoxicidade é consistente com o observado na hepatite viral (SHERMAN et al., 2019a) pelo fato de compartilharem estruturas homólogas ao da hepatite C, conhecido como hepacivírus (SIMMONDS et al., 2017). Outros estudos apontam que o ZIKV deve atuar de forma semelhante ao vírus da Dengue (JOOB; WIWANITKIT, 2019). Estudos do nosso grupo têm demonstrado que infecções virais causam aumento dos níveis de glicogênio hepático, isso pode estar associado à deficiência da enzima glicose-6-fosfatase G6P no organismo (CAMACHO et al., 2005), produzida pela quebra do glicogênio em glicose. A queda nos níveis dessa enzima pode estar associada ao acúmulo de glicogênio no fígado

2 JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus é uma das principais causas de morbimortalidade em nível mundial, sendo um problema de saúde pública que afeta cerca de 422 milhões de adultos em todo o mundo. Já é conhecido que o quadro de diabetes associado à lesão hepática torna essa lesão mais complexa, pois se sugere que o diabetes seja um ponto inicial para

a lesão hepática e sua evolução a um quadro de lesão crônica. A incidência de diabetes tem aumentado com o decorrer dos anos e é sabido que pacientes diabéticos demonstram sintomas em infecções virais mais agravadas. O aumento nos números de casos de infecção pelo ZIKV no Brasil e sua semelhança ao vírus da hepatite e da dengue levanta o questionamento sobre seus efeitos no fígado. Estudos já apontam que o ZIKV consegue replicar-se nos hepatócitos e que, embora não se saiba o mecanismo, o ZIKV causa lesão hepática.

Diante deste contexto, a associação da diabetes e a infecção por ZIKV pode causar a potencialização dos danos que ambos provocam ao fígado. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos para se descrição dos mecanismos patológicos relacionados à infecção por ZIKV e se as alterações já causadas pela diabetes podem ser exacerbadas pela infecção concomitante com o ZIKV.

3 HIPÓTESE

A infecção com ZIKV leva a danos ao parênquima hepático e este dano é potencializado pela diabetes.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Identificar os efeitos da associação do diabetes mellitus e a infecção do ZIKV sobre o parênquima hepático de camundongos BALB/c machos e danos hepáticos associados com Zika, dengue e febre amarela em experimentação animal.

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar as alterações hepáticas causadas por dengue, zika vírus e febre amarela.
- b) Avaliar os níveis de marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo - óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA) - no fígado.
- c) Avaliar alterações dos padrões de atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) no fígado.
- d) Avaliar marcadores bioquímicos associados à funcionalidade hepática.

- e) Descrever a morfologia microscópica hepática em modelo de camundongo diabético tratado com zika vírus.

CAPÍTULO 1

Danos hepáticos causados por flaviviruses: uma revisão sistemática

Publicado em: Life Sciences

Pinheiro, B. S. S., Rodrigues, J. G., Dias, F. C. R., de Oliveira Gomes, A., & Gomes, M. D. L. M. (2023). Hepatic damage caused by flaviviruses: A systematic review. Life Sciences, 122074.

1 INTRODUÇÃO

Os flavivírus são vírus icosaédricos da família *Flaviviridae*. Eles possuem uma estrutura envelopada e um genoma de RNA de fita simples positivo, e sua replicação ocorre no citoplasma (ZHANG et al., 2003). Estes vírus representam um desafio significativo para a saúde global, pois têm a capacidade de infectar artrópodes e mamíferos, com uma taxa de infecção anual de até 400 milhões de pessoas em todo o mundo (PIERSON; DIAMOND, 2018). Os artrópodes, especialmente carrapatos e mosquitos, servem como vetores de flavivírus e são comumente encontrados em regiões tropicais densamente povoadas, melhorando assim o risco de infecção para uma parcela significativa da população global (DAEP et al., 2014). Flavivírus bem conhecidos incluem o vírus Zika (ZKV), vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus da hepatite C (HCV), West Nile, encefalite transmitida por carrapatos, Palm Greek, vírus da encefalite japonesa e vírus do rio Parramatta (ANWAR et al., 2022; FRANK; SONG; LEE, 2022; KOH et al., 2021; NADEEM et al., 2023; NICOLLE et al., 2004). Os mosquitos transmitem todos esses vírus, exceto o HCV, que é transmitido principalmente através do contato com secreções e fluidos corporais infectados (ARAÚJO et al., 2018).

A maioria dos vírus mencionados acima apresenta frequentemente manifestações assintomáticas ou leves, como vômitos, febre, dor de cabeça e mal-estar, destacando a importância de compreender seus potenciais efeitos tóxicos para prevenir doenças silenciosas. No entanto, também foram relatados casos mais graves, incluindo hemorragia, choque, encefalite, meningite, síndrome congênita do ZKV, bem como insuficiência renal e hepática (VAN LEUR, 2021). Essas ocorrências ressaltam a necessidade de mais pesquisas sobre esses vírus, principalmente em relação aos seus efeitos hepáticos. Está bem estabelecido que os hepatócitos são suscetíveis à replicação viral e o fígado desempenha um papel vital na manutenção da homeostase geral do corpo (SHERMAN et al., 2019).

O fígado, o maior órgão interno do corpo humano, desempenha papéis cruciais na produção e secreção de bile e proteínas, nos processos de desintoxicação e no armazenamento de glicose, vitaminas e minerais. Consequentemente, torna-se um foco altamente importante para a pesquisa científica (SAKINAH et al., 2017). Foi estabelecido que certos flavivírus podem induzir alterações hepáticas, sendo necessárias mais investigações para melhor compreender e caracterizar os mecanismos de ação envolvidos.

Essa compreensão pode abrir caminho para a prevenção de doenças e tratamentos eficazes para infecções virais (SHRESTA et al., 2006).

Complicações hepáticas são observadas em 60-90% dos pacientes infectados pelo vírus da dengue, ressaltando a importância da detecção precoce de danos hepáticos na redução das taxas de morbidade e mortalidade (SAMANTA; SHARMA, 2015). Nos casos de febre amarela, o fígado é o órgão mais afetado em comparação aos demais, pois o vírus apresenta maior tropismo por esse órgão específico. Este envolvimento do fígado leva à icterícia pronunciada devido a danos nas células do fígado (hepatócitos) e comprometimento da função hepática [SHERMAN et al., 2019].

Portanto, esta revisão sistemática valida estudos com infecções por flavivírus e seus efeitos no fígado, elucidando possíveis mecanismos de ação, identificando assim alvos para estratégias de prevenção, vacinação e tratamento. Estes estudos contribuem para questões relevantes para a prática clínica, consolidando as evidências sobre alterações hepáticas induzidas por flavivírus. A revisão abrange aspectos relevantes como alterações teciduais, bioquímicas e celulares que ocorrem em decorrência da infecção. Além disso, fornece informações sobre modelos animais e cepas utilizadas em pesquisas, destacando potenciais reservatórios temporários no fígado. A avaliação da qualidade metodológica também foi realizada para todos os estudos incluídos, identificando as principais fontes de viés que poderiam comprometer a qualidade do estudo. Finalmente, poderão ser propostas direções futuras para o estudo dos mecanismos moleculares responsáveis por estas complicações, bem como opções para o tratamento dos danos induzidos pela infecção.

2 METODOLOGIA

2.1 Estratégia de busca e questão de pesquisa

O desenho da pesquisa utilizou a estratégia PICO (população, intervenção, comparação e desfecho) (METHLEY et al., 2014) que permitiu definir as seguintes questões norteadoras: Que alterações e efeitos hepatotóxicos são causados pelos flavivírus? Quais são os mecanismos de replicação desses flavivírus no fígado? Quais cepas animais são as mais utilizadas em estudos envolvendo flavivírus? Qual espécie animal se mostrou mais viável para pesquisa viral? Qual rota de inoculação do vírus é

mais semelhante à infecção na natureza? O número de protocolo do Registro Internacional de Revisão Sistemática Prospectiva (PROSPERO) é CRD42023389009.

As diretrizes PRISMA (HOOIJMANS et al., 2014) foram aplicadas como um guia para seleção, triagem e elegibilidade de artigos para realizar esta revisão sistemática. No dia 24 de agosto de 2022, às 15h12, foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas seguintes bases de dados: PubMed/Medline, Web of Science e Scopus. O operador booleano “AND” foi utilizado para combinar o termo “flavivirus” com os demais termos descritos, resultando nas seguintes combinações: (flavivirus* AND liver*), (flavivirus* AND hepatocytes*), (flavivirus* AND hepatic disease*) e (flavivirus* AND hepatic cell*) (Tabela S1). Por meio dos softwares Rayyan e Endnote, o banco de dados gerado foi organizado com exclusão automática e manual de artigos duplicados.

2.2 Seleção de estudos

A inclusão do artigo foi realizada de forma independente por dois pesquisadores (BSSP e JGR). O teste Kappa (Kappa= 0,9) foi aplicado para verificar o nível de concordância entre os pesquisadores. Em caso de dúvida, pesquisadores independentes (MLMG e FCRD) foram solicitados a analisar se os artigos atendiam aos critérios de elegibilidade, evitando qualquer tipo de viés durante a seleção dos estudos.

Os critérios de inclusão foram: (1) estudos sobre os flavivírus da Dengue, Zika, Hepatite Tipo C, Febre Amarela e Chikungunya, (2) estudos com experimentos em animais, (3) estudos que demonstraram avaliações hepáticas relacionadas aos flavivírus escolhidos. Artigos de revisão, estudos de caso, capítulos de livros e estudos observacionais foram excluídos. Além disso, estudos com outras abordagens como os que avaliaram outros vírus ou com patologias associadas.

O processo de extração de dados foi realizado com base em (i) particularidades da publicação do estudo (país de origem, autores, ano), (ii) tipo de estudo e modelo experimental (in vivo, experimental, espécie animal, tamanho da amostra, vírus, eutanásia), (iii) tratamento (título viral, cepa, via de administração), (iv) mecanismo de ação (estoque de vírus de propagação, alteração hepática, imunossupressão). Ao final da extração, as informações discordantes foram analisadas e corrigidas.

2.3 Risco de viés

A análise da qualidade metodológica foi realizada por meio da ferramenta SYRCLE (Systematic Review Center for Experimentation with Laboratory Animals) denominada Risk of Bias (HOOIJMANS et al., 2014). A avaliação partiu das questões Q1, Q2 e Q3 sobre viés de seleção, Q4 sobre viés de desempenho, Q5 sobre viés de detecção e outros vieses não compreendidos nos domínios anteriores, como Q6 presença de informações sobre a cepa utilizada, Q7 sobre titulação viral, Q8 em aprovação no comitê de ética e Q9 se a metodologia aplicada era confiável e replicável.

A partir da utilização do software Review Manager 5.3, o gráfico SYRCLE foi elaborado a partir da sinalização de "sim" (baixo risco de viés), "incerto" (quando a informação não foi relatada com clareza) e "não" (alto risco de viés). Os principais aspectos dos artigos foram resumidos de acordo com os objetivos da revisão e sua especificidade. Os critérios de viés, bem como a aderência dos estudos selecionados, foram apresentados como valores relativos e absolutos (HOOIJMANS et al., 2014).

3 RESULTADOS

3.1. O processo de revisão

Inicialmente, 12.745 registros foram identificados por meio da pesquisa bibliográfica no Pubmed (2.144), Scopus (6.028), Web of Science (376) e Embase (4.197). Foram excluídos 5.971 artigos duplicados e 6744 artigos. Dezoito artigos foram incluídos nesta revisão sistemática (Figura 1).

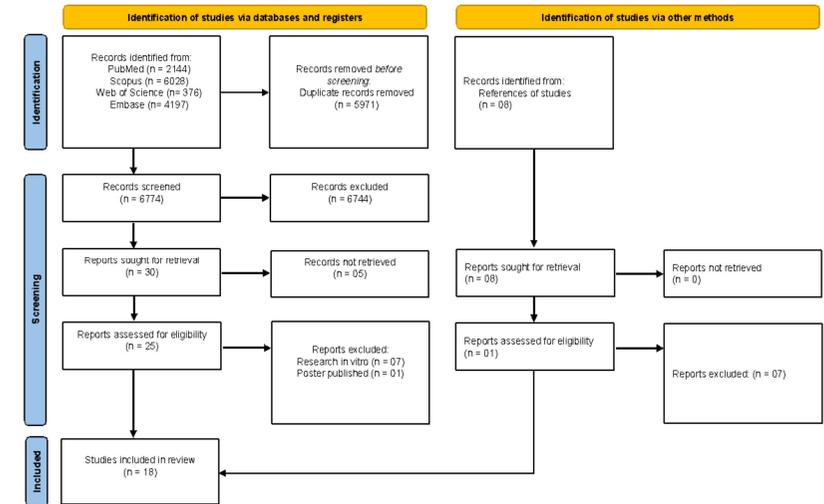


Figura 1. Diagrama esquemático do processo de revisão, seguindo a plataforma PRISMA.

Os estudos foram realizados em oito países: Brasil (28%, n=05), China (11%, n=02), Estados Unidos da América (17%, n=03), Japão (11%, n=02), Cingapura (11%, n=02), Tailândia (11%, n=02), Taiwan (6%, n=01) e Malásia (6%, n=01) (Figura 2). Apenas 61% dos artigos analisados continham dados sobre a aprovação do comitê de ética. Essa informação esteve presente em 80% desses artigos desenvolvidos no Brasil, 66,7% nos Estados Unidos da América, 50% na Tailândia e em 100% dos estudos na China e Cingapura. Por outro lado, 85% dos artigos realizaram análise estatística. Os dados foram coletados em experimentos realizados em macacos (5%), hamsters (10%), embriões de galinha (10%) e camundongos (75%). Entre os 18 artigos incluídos, 14 foram de dengue, 3 de febre amarela e 1 de Zika. Nenhum artigo sobre Chikungunya e hepatite C que atendiam aos critérios de inclusão foram encontrados. Nos estudos de febre amarela, 50% dos animais eram hamsters e 25% cada eram camundongo e macaco. Nos testes de dengue, 93,3% dos modelos eram camundongos, enquanto 6,7% eram embriões de galinha. Todos os projetos realizados com ZKV foram feitos em embriões de galinha (Tabela 1).

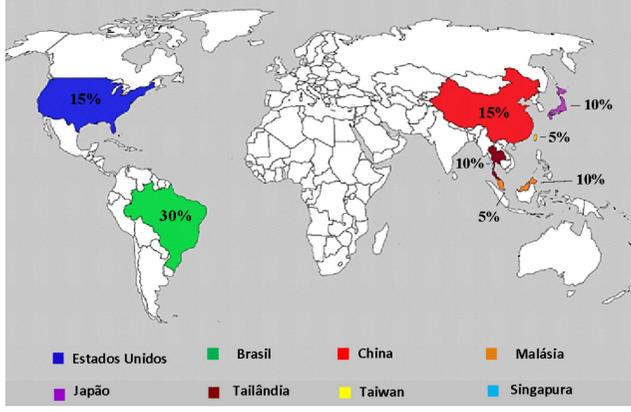


Figura 2. Proporção de países onde os artigos selecionados foram desenvolvidos.

3.2. Características virais

As vias de administração viral foram a intraperitoneal (45%), a intravenosa (25%), a subcutânea (15%) e a intracerebral (15%) (Tabela 1). O DENV foi inoculado em 46,7% dos estudos por via intraperitoneal, 26,7% por via intravenosa, 13,3% por via subcutânea e 13,3% por via intracerebral. Nos estudos de YFV, o vírus foi administrado 50% por via intraperitoneal, 25% por via subcutânea e 25% por via intravenosa. No caso do ZKV, 100% da inoculação viral ocorreu por via intracerebral. O estoque de propagação viral foi realizado em células c6/36 (80%), células Vero (5%), BHK-21 (5%), enquanto 10% dos estudos não apresentaram esta informação. O título viral estava descrito em 90% dos estudos e 20% não informaram o volume utilizado. As cepas utilizadas não foram relatadas em 25% dos estudos (Tabela 2) e, com exceção das cepas YFV-Dakh1279 (YFV-Dakar), D2Y98P e DENV-2 (cepa C da Nova Guiné) que foram encontradas em 10%, 10% e 15% dos estudos respectivamente, todos os demais foram aplicados em apenas um artigo com percentual de 5% para cada (Tabela 2).

Tabela 1. Principais características dos estudos selecionados que avaliaram infecção por ZIKV, DENV e YFV no fígado (DENV: vírus da dengue, ZKV: vírus zika e YFV: vírus da febre amarela).

Vírus	País	Espécies	Via de administração	Total de animais	Ética	Estatísticas	Referências
DENV	China	Camundongos C57BL/6	Intravenoso	N/D	Sim	T Student e ANOVA	Liu et al., 2022
DENV	Brasil	BALB/c	Intravenoso	10	Sim	Mann-Whitney e regressão linear	Paes et al., 2009
DENV	Malásia	BALB/c	Intraperitoneal	12	Não	N/D	Sakinah et al., 2017
DENV	Brasil	Camundongos BALB/c	Intraperitoneal	8	Sim	t Student e Kruskal-Wallis	Paes et al., 2005
DENV	Taiwan	Camundongos C57BL/6	Intravenoso	N/D	Não	Correlação	Chen et al., 2004
DENV	Brasil	Camundongos BALB/c	Intraperitoneal	N/D	Sim	t Student e Mann-Whitney	Barth et al., 2006
DENV	Cingapura	129/ Camundongos Sv	Intraperitoneal	N/D	Sim	t Student	Tan et al., 2010
DENV	Singapura	Camundongos AG129	Subcutâneo	N/D	Sim	t Student	Tan et al., 2011
DENV	Tailândia	Camundongos Swiss	Intraperitoneal	100	Não	N/D	Boonpucknavig et al., 1981
DENV	Brasil	BALB/c	Subcutâneo	24	Não	One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey	França et al., 2010
DENV	Japão	Camundongos SCID (CB-17/1er Tacséid)	Intraperitoneal	N/D	Não	t Student	An et al., 1999
DENV	Japão	BALB/c	Intraperitoneal	20	Não	Teste de distribuição F.	Hotta et al., 1981

DENV	Estados Unidos da América	129/ Camundongos Sv	Intravenoso	N / D	Sim	t Student com correlação com Welch's e Tukey tet	Shrestha et al., 2006
DENV	China	Embrões de galinha	Intracerebral	N / D	Sim	t de Student e ANOVA	Zhang et al., 2019a
ZKV	Tailândia	Ratos suíços	Intracerebral	8	Sim	N / D	Win et al., 2019
ZKV	China	Embrões de galinha	Intracerebral	N / D	Sim	t de Student e ANOVA	Zhang et al., 2019b
YFV	Estados Unidos da América	Hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Intraperitoneal	52	Sim	t de Student	Xiao et al., 2003
YFV	Brasil	Macacos <i>rhesus</i>	Subcutâneo	4	Sim	t de Student	Bailey et al., 2020a
YFV	Brasil	Camundongos WT C57BL/6J, camundongos hFRG e muFRG	Intravenoso	22	Sim	t de Student	Bailey et al., 2020b
YFV	Estados Unidos da América	Hamsters	Intraperitoneal	7	Não	t de Student	McArthur et al., 2005

N/D: não disponível.

Tabela 2. Descrição das características da infecção dos animais, vírus, cepa viral, titulação, alterações hepáticas e dieta. (DENV: vírus da dengue, ZKV: vírus zika e YFV: vírus da febre amarela.)

Vírus	Titulação viral	Cepa	Estoques de vírus propagados	Volume	Imunossupressão	Danos hepáticos	Dieta dos animais	Referências
DENV	5×10^6 PFU DENV-3	N / D	Células C6/36	N / D	Não	Resistência à insulina nos hepatócitos	D12492 (dieta para roedores com 60 kcal% de gordura)	Liu et al., 2022
DENV	10.000 dose média de cultura de tecido infeccioso (TCID50)	N / D	Células C6/36	2 mL	Não	Esteatose, edema de hepatócitos, hemorragia e necrose com infiltrado inflamatório, ruptura endotelial em várias veias centrais, necrose em capilares sinusoidais	N / D	Paes et al., 2009
DENV	5×10^5 FFU/mL	DENV 2 3738	Células C6/36	1 mL	Não	Hemorragia, esteatose, necrose, apoptose, edema, formação de vacúolos, microesteatose nos hepatócitos e afrouxamento dos espaços sinusoidais, hiperplasia das células de Kupffer e aumento dos hepatócitos binucleados e células apoptóticas	N / D	Sakinah et al., 2017

DENV	10^4 TCID50/0,2mL)	N / D	Células C6/36	0,2 mL	Não	Vacuolização e esteatose nos hepatócitos, aumento dos níveis de ALT e AST, necrose	N / D	Paes et al., 2005
DENV	10^8 PFU	DENV 2 cepa 16681	Células C6/36	0,5 mL	Sim	Aumento dos níveis de ALT e AST, presença de células apoptóticas	N / D	Chen et al., 2004
DENV	10.000 TCID50/0,2 mL	N / D	Células C6/36	0,1 ml	Não	Veias portal e centrolobulares congestionadas, esteatose, vacuolização de hepatócitos	N / D	Barth et al., 2006
DENV	10^7 a 10^2 PFU	D2Y98P den 2	Células C6/36	0,4 mL	Não	Edema, hemorragia, vacuolização dos hepatócitos e aumento dos níveis de ALT e AST	N / D	Tan et al., 2010
DENV	10^7 a 10^4 PFU	D2Y98P	Células C6/36	0,1 mL	Sim	Necrose, vacuolização dos hepatócitos, aumento dos níveis de AST e ALT	N / D	Tan et al., 2011
DENV	$2,5 \times 10^8$ *3LDs0	DENV-2, Neti Guiné C	N / D	0,5 mL	Não	Granulomatose e inflamação	N / D	Boonpucknavig et al., 1981
DENV	10^5 PFU	DENV-2 (cepa C da Nova Guiné) e DENV-4 (cepa H241)	Células C6/36	100 µL	Sim	Hiperplasia das células de Kupffer, aumento do infiltrado de células inflamatórias perto dos ductos biliares, aumento dos níveis de ALT e AST	N / D	França et al., 2010
DENV	10^6 PFU	DENV-2 (cepa Tr1751)	Células C6/36	N / D	Sim	Hemorragia leve, congestão e edema nas células hepáticas, edema dos hepatócitos, vacuolização citoplasmática e hipertrofia das células de Kupffer	N / D	An et al., 1999
DENV	$10^{7,8}$ PFU	DENV-1, Mochizuki	BHK-21	0,5 mL	Não	Degeneração hialina acidófila nas células de Kupffer	N / D	Hotta et al., 1981
DENV	10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 PFU	D2S10	Células C6/36	1 e 2ml	Sim	Infiltrados inflamatórios na triade portal, hepatócitos dilatados e multivesiculares, com aspecto vacuolizado	N / D	Shresta et al., 2006
DENV	N / D	N / D	N / D	20 µL	Não	Necrose hepática, esteatose, hiperplasia de células de Kupffer	N / D	Win et al., 2019
DENV	0, 200 e 10^4 PFU	DENV-2 (cepa C da Nova Guiné (DENV-2 NGC, GenBank #: NC_001474)	Células C6/36	2 µL	Não	Inflamação	N / D	Zhang et al., 2019a

Zika vírus	5, 50 e 500 PFU	Células C6/36	2 µL	Não	Inflamação e danos no fígado	N/D	Zhang et al., 2019b
ZKV	5, 50 e 500 PFU	Células C6/36	2 µL	Não	Inflamação e danos no fígado	N/D	Zhang et al., 2019b
YFV	N/D	Células Vero	N/D	Não	Necrose, inflamação	N/D	McArthur et al., 2005
YFV	10^6 TCID ₅₀ de YFV	Células C6/36	N/D	Não	Esteatose, apoptose, aumento dos níveis de ALT e bilirrubina total	N/D	Xiao et al., 2003
YFV	550 FFU (5×10^4 TCID ₅₀)	Células C6/36	1 mL	Não	Apoptóticos e esteatóticos, áreas de necrose e reação tecidual inflamatória mínima	N/D	Bailey et al., 2020a
YFV	2×10^3 FFU de YFV	Células C6/36	50 µL	Não	Apoptóticos e esteatóticos, áreas de necrose e reação tecidual inflamatória mínima	Suplementado com nistina (CurX Nistione, Yecuris) na água potável	Bailey et al., 2020b

N/D: não disponível.

3.3. Alterações hepáticas

As alterações histológicas do fígado foram analisadas em 90% dos estudos. Estudos DENV (75%, n=15) descreveram esteatose (33,3%, n=05), necrose (33,3%, n=05), hemorragia (26,7%, n=04), hiperplasia (20%, n=03), apoptose (13,3%, n=02), hipertrofia (13,3%, n=02) e congestão da veia porta/central (13,3%, n=02). Na YFV (20%, n=04), foram descritas esteatose hepática (75%, n=03), apoptose (75%, n=03) e necrose (75%, n=03). Infecção pelo ZKV, inflamação (100%, n=01) e dano hepático foram citados sem detalhamento (100%, n=01) (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre as alterações hepáticas para cada flavivírus (DENV = vírus da dengue, YFV = vírus da febre amarela, ZKV = vírus zika).

	DENV	YFV	ZKV
Análise de tecido	Esteatose Edema intercelular Hemorragia Necrose Inflamação Lesão Apoptose Hiperplasia de células de Kupffer Hipertrofia de hepatócitos Vacuolização de hepatócitos Congestão das veias porta e centrolobulares	Esteatose Apoptose Necrose Inflamação	Inflamação (infiltração de monócitos)
Análise bioquímica	Elevação de ALT Elevação de AST Resistência à insulina nos hepatócitos	Elevação ALT Elevação da bilirrubina total	N/D

ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase. N/D: não disponível.

Apenas 30% dos estudos incluídos analisaram marcadores de dano hepático: 83,3% (n=05) dos estudos DENV mostraram níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT, 33,3%, n= 05) e aspartato aminotransferase (AST, 33,3%, n= 05), enquanto estudos de YFV (n=25%) mostraram elevação dos níveis de ALT (25%, n=01) e bilirrubina total (25%, n=01). Os estudos do ZKV não forneceram essas informações.

3.4. Risco de viés

Nenhum dos estudos selecionados apresentou informações sobre geração de sequência (Q1), ocultação de alocação (Q3) e acomodação aleatória (Q4). Apenas 10% (n=2) relataram características basais (Q2) de similaridades de grupos, enquanto 75% (n=15) dos estudos não apresentaram cegamento (Q5) dos tratadores de animais. A informação sobre as cepas animais (Q6) não foi descrita em 25% (n=5) dos estudos e em 10% (n=2) a titulação viral (Q7) não foi relatada. A metodologia mostrou-se confiável e replicável (Q8) em 60% (n=8) dos estudos, entretanto, 35% (n=7) deles não informaram a aprovação do comitê de ética (Q9) (Figura 3).

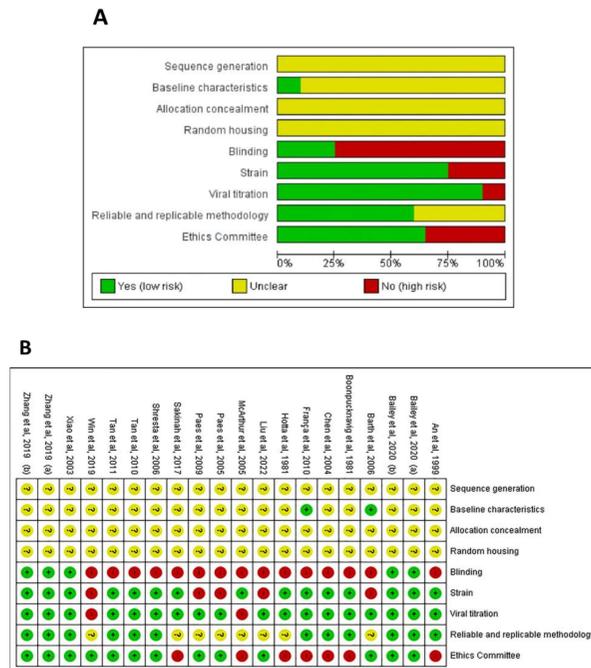


Figura 3. Risco de viés: revisão dos julgamentos dos autores sobre cada item de risco de viés apresentado como porcentagens em todos os estudos incluídos. **B.** Resumo do Risco de viés. Os itens no Centro de Revisão Sistemática para Experimentação com Animais de Laboratório (SYRCLE) com risco de avaliação de viés foram pontuados com "sim" indicando baixo risco de viés, "não" indicando alto risco de viés ou "incerto" indicando que o item não foi relatado, resultando em um risco desconhecido de viés.

3 DISCUSSÃO

Embora as investigações sobre flavivírus sejam de interesse para a saúde pública, suas fisiopatologias ainda não estão claras, pois a disponibilidade de tecidos infectados só é possível em casos fatais e em modelos experimentais, mas possuem limitações, pois não refletem totalmente os eventos naturais de propriedades patogênicas humanas (PAES et al., 2009; TAN et al., 2010). Esta revisão fornece informações importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação desses vírus, indicando os melhores modelos experimentais e orientando pesquisas com possíveis alvos terapêuticos para essas infecções.

Os principais modelos experimentais utilizados para estudos de infecção por DENV são camundongos (linhagens BALB/c, AG129, C57BL/6 e Swiss) e embriões de galinha. A infecção observada em camundongos BALB/c induz alterações hepáticas semelhantes às causadas no corpo humano, com aumento dos níveis séricos das transaminases ALT e AST coincidindo com o pico de inflamação celular encontrado no fígado (FRANÇA et al., 2010). Além disso, outras lesões também relatadas em humanos foram observadas neste modelo, como esteatose hepática, necrose e apoptose, infiltrados inflamatórios nos capilares sinusoidais e no espaço portal, além de vacuolização/inchaço dos hepatócitos. Assim, a espécie BALB/c é considerada um modelo experimental viável para estudos de patogênese viral, farmacodinâmica e possível desenvolvimento de vacinas para infecções por DENV (PAES et al., 2005; BARTH et al., 2006; PAES et al., 2009; SAKINAH et al., 2017; SHASTRI et al., 2020).

A espécie de camundongo AG129 é indicada para a investigação do tropismo DENV, extravasamento vascular, manifestações clínicas, cinética de doenças e patogênese em condições de distúrbio funcional do sistema imune adaptativo. O AG129 mostrou-se útil para testes de vacinas e medicamentos, porém, apresenta suscetibilidade heterogênea à infecção, dependendo da cepa de DENV utilizada (SHERESTA et al., 2006; SCHUL et al., 2007; TAN et al., 2010; TAN et al., 2011).

Os camundongos C57BL/6 utilizados em estudos sobre DENV também apresentam aspectos semelhantes aos esperados no corpo humano: hemorragia, apoptose, produção de TNF- α , resistência à insulina nos hepatócitos e elevação dos níveis de ALT e AST (CHEN et al., 2004; LIU et al., 2022). No entanto, a extensão do dano viral é dependente da quantidade de vírus inoculada nesses camundongos, demonstrando uma condição diferente do que ocorre na natureza. O uso de camundongos C57BL/6 é indicado para investigar aspectos hemorrágicos causados pelo DENV (FRANÇA et al., 2010).

Embriões de galinha são usados como modelo para estudos de desenvolvimento fetal, juntamente com infecções por DENV e ZKV. A infecção induzida pelo DENV está relacionada com baixo peso ao nascer e prematuridade (PAIXÃO et al., 2016; SHARMA et al., 2016), enquanto a infecção pelo ZKV induz microcefalia, com replicação viral em diferentes órgãos (GOODFELLOW, 2016). Embriões de galinha apresentaram maior resposta inflamatória e lesão hepática mais grave quando infectados com ZKV, sendo o modelo mais adequado para esse tipo de abordagem (ZHANG et al., 2019).

Embora muitos modelos animais com DENV tenham sido estudados e comprovadamente susceptíveis à infecção por esse flavivírus, não existe um modelo padrão completamente semelhante à infecção humana, pois apenas humanos e mosquitos são os vetores naturais (além dos primatas na febre amarela) e as respostas à infecção dependerão da cepa, vírus carga utilizada e via de infecção utilizada (FRANÇA et al., 2010).

Hamsters são frequentemente utilizados para estudos de febre amarela, podendo desenvolver viremia e manifestar alterações patológicas semelhantes às esperadas em humanos (XIAO et al., 2003; MCARTHUR et al., 2005). No entanto, os hospedeiros naturais do YFV são primatas, o que os torna o modelo experimental mais compatível, semelhante aos humanos. Experimentos com macacos e camundongos causaram danos esperados segundo a virologia, critérios patológicos e clínicos, com impactos importantes nos hepatócitos, causando danos hepáticos e coagulopatia (somente em macacos) (BAILEY et al., 2020).

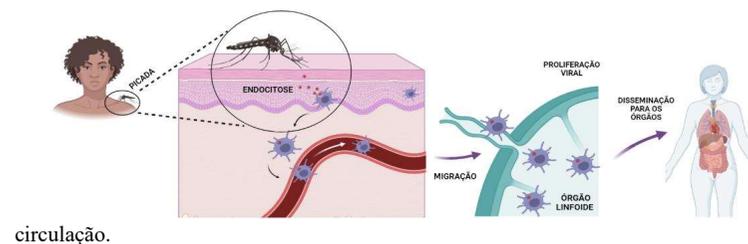
A via mais comum de infecção viral foi através de injeção intraperitoneal. Essa forma de infecção causou um pico nos níveis de aminotransferase semelhante ao observado em casos humanos de dengue, bem como um aumento na viremia plasmática semelhante ao observado em homens e mulheres (KUO et al., 1992; PAES et al., 2005). Por outro lado, Barth et al. (2006) demonstraram uma infecção mais branda quando comparada a outros modelos animais usando vias de administração diferentes da intraperitoneal (AN et al., 1999; XIAO et al., 2003; SAKINAH et al., 2017).

A inoculação viral intravenosa causou lesões mais precoces e áreas mais extensas de dano hepático devido a infecções por DENV e YFV. No entanto, esta via de administração tem evidenciado a resistência natural dos animais à infecção (SHRESTHA et al., 2006; PAES et al., 2009; BAILEY et al., 2020). Assim, a via intracerebral torna-se uma opção mais viável, o que resulta em viremia próxima ao que ocorre em humanos, tanto com infecções por ZKV quanto por DENV (WIN et al., 2019; BAILEY et al., 2020).

A via subcutânea é a que melhor mimetiza a infecção natural dos 3 vírus no corpo humano. No entanto, esta via causa taxas de mortalidade mais altas e mais rápidas em camundongos quando comparada à via intraperitoneal. Assim, a via intraperitoneal é a escolhida, pois é possível fazer mais observações por um período mais longo (TAN et al., 2010; TAN et al., 2011; BAILEY et al., 2020).

A entrada dos flavivírus no corpo humano ocorre a partir da picada do mosquito *Aedes aegypti*. Os vírus são inoculados na epiderme e então endocitados por células dendríticas (alvo comum para diferentes flavivírus) ou queratinócitos. Em seguida, os vírus migram para os órgãos linfoides e se espalham pela circulação para todo o corpo (PIERSON E KIELIAN, 2013; BRIANT et al., 2014). A replicação viral pode ocorrer em vários órgãos. O DENV se replica no cérebro, olhos, fígado, coração e baço, além da circulação sistêmica. O ZKV se replica nos olhos, fígado e cérebro (ZHANG et al., 2019), enquanto o YFV se replica no cérebro e no fígado (BAILEY et al., 2020) (Figura 4).

Figura 4. Esquema de infecção por flavivírus a partir da inoculação do vírus pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. O mosquito inocula os vírus na epiderme do ser humano e as células dendríticas ali presentes endocitam os vírus, migram para os órgãos linfoides pelos vasos sanguíneos, replicam-se e se disseminam para os outros órgãos do corpo pela



circulação.

A replicação viral hepática tem como alvo hepatócitos, células de Kupffer e até tecidos peritoneais e seus arredores, espaço portal e veias centrolobulares. Muitas alterações hepáticas causadas por flavivírus são descritas, e as mais comuns são a esteatose, infiltrados celulares, fibrose, apoptose, necrose, hemorragia, hiperplasia das células hepáticas e aumento dos níveis de bilirrubina e aminotransferases (CHEN et al., 2004; PAES et al., 2005; BARTH et al., 2006; PAES et al., 2009; CHAIX et al., 2015; BAILEY et al., 2020).

A esteatose hepática, encontrada em 50% dos estudos selecionados, caracteriza-se pela deposição de gotículas de gordura macro ou microvesiculares em pelo menos 5% dos hepatócitos (NASSIR, 2015). Está associada ao aumento da inflamação sistêmica e é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (KUROSAKI et al., 2010; NDUMELE et al., 2011). O metabolismo lipídico está alterado nessas infecções virais, causando armazenamento excessivo em hepatócitos com a finalidade de replicação do patógeno, pois essa circunstância auxilia na infecção inicial para a segregação das proteínas do capsídeo viral e, posteriormente, na encapsidação do genoma sintetizado (SAMSA et al., 2009). Em muitos indivíduos, a esteatose progride para esteato-hepatite e fibrose. A fibrose tem sido descrita como um efeito dos flavivírus, que pode levar à cirrose, sendo caracterizada como uma cicatriz em resposta ao dano hepático, trazendo rigidez no parênquima hepático devido à deposição de colágeno no espaço extracelular (DUAN et al., 2022). Esse processo também pode prejudicar a microcirculação e a perfusão hepáticas (YOON et al., 2022).

A presença de infiltrados celulares, geralmente células mononucleares (monócitos e macrófagos), caracteriza a inflamação hepática desencadeada pelos três flavivírus. Essa infiltração leva ao aumento da viremia, o que implica em uma manifestação mais grave da doença (BOONPUCKNAVIG et al., 1981; AN et al., 1999; MCARTHUR et al., 2005; SHRESTA et al., 2006; SAKINAH et al., 2017; ZHANG et al., 2019; LIU et al., 2022). A hiperplasia de células hepáticas causada por DENV e YFV ocorre devido à suscetibilidade dessas células à replicação viral, portanto sofrem seus efeitos citopáticos (SHRESTA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010; SAKINAH et al., 2017; WIN et al., 2019). Além disso, a hiperplasia e a hipertrofia das células de Kupffer se devem ao intenso processamento de muitas substâncias no processo infeccioso, uma vez que são células fagocitárias (FRANÇA et al., 2010; BAILEY et al., 2020).

Células de Kupffer e outros macrófagos são capazes de reconhecer partículas virais no fígado e sinalizar a liberação de quimiocinas e citocinas, que ativam células inflamatórias e atuam como apresentadoras de antígenos neste local. Nas infecções por DENV e YFV, as células Th1 liberam citocinas pró-inflamatórias, induzindo vasodilatação (para maior infiltração de células de defesa) e dano celular. A expressão do ligante indutor de apoptose, que causa perda da integridade do parênquima do órgão, induzida por células NK (natural killer), ocorre com aumento da caspase 3 clivada no tecido hepático (ZELLWEGGER et al., 2010; SUNG et al., 2012), explicando a apoptose de hepatócitos que foi encontrada em 25% dos estudos desta revisão, tanto em artigos

sobre dengue quanto em artigos de febre amarela (XIAO et al., 2003; CHEN et al., 2004; SAKINAH et al., 2017; BAILEY et al., 2020).

Localmente, a cascata inflamatória causa extravasamento de células sanguíneas, causando morte tecidual patológica (necrose), encontrada em 33,3% dos estudos de DENV. O agravamento ocorre devido a intensas hemorragias, com diminuição da concentração de hemácias circulantes e da oferta de oxigênio, demonstrando que os modelos de infecção estão de acordo com o geral de humanos infectados pelo DENV (PAES et al., 2005; MCARTHUR et al., 2005; PAES et al., 2009; TAN et al., 2011; SAKINAH et al., 2017; WIN et al., 2019; BAILEY et al., 2020). Habitualmente, esta necrose, caracterizada por núcleos picnóticos, cariólise ou cariorrhexe dos hepatócitos, ocorre no centro lobular do fígado por ser um local com normalmente menor concentração de oxigênio (TAN et al., 2011; SAMANTA E SHARMA, 2015).

No início da infecção, o vírus se replica nos monócitos que vão ativar as células T (principalmente TCD8), o que é confirmado pelo aumento dos níveis de CD69 (CHEN et al., 2004). A ativação das células T induz o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- γ (CHEN et al., 2004; FRANÇA et al., 2010). O aumento de TNF- α , interferon- γ , IL1, IL6 e óxido nítrico leva ao aumento da permeabilidade das células endoteliais hepáticas. A maior permeabilidade, junto à manutenção dos níveis de albumina e diminuição dos níveis de hematócrito, permite a passagem do exsudato, explicando a presença de edema de hepatócitos, hemorragia, infiltrado inflamatório, edema e vacuolização das células endoteliais. Níveis mais elevados de TNF- α causam regulação negativa do IRS1, resultando em resistência insulínica dos hepatócitos, diminuindo o consumo de glicose, estimulando assim a gliconeogênese e a lipogênese. O aumento amplamente relatado nos níveis de esteatose é observado com o aumento da lipogênese (BARTH et al., 2006; TAN et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; LIU et al., 2022). Além disso, o aumento do nível de TNF- α também causa alterações morfológicas mitocondriais, reduzindo a eficiência na síntese de ATP, o que ativará a cascata de apoptose e aumentará os níveis de ATP glicolítico (dos músculos) (EL-BACHA et al., 2007; RODHAIN, 2022) (Figura 14).

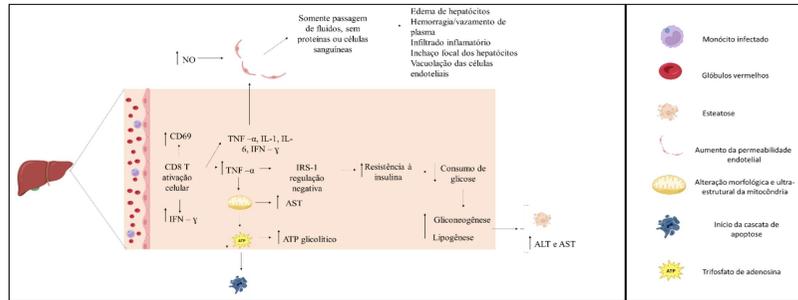


Figura 5. Mecanismo de ação das flaviviroses no fígado. O vírus se replica em monócitos, que ativam células T (principalmente TCD8+). A ativação das células T leva ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ . Isso resulta em maior permeabilidade das células endoteliais hepáticas, causando edema de hepatócitos, hemorragia e infiltrado inflamatório. Níveis mais elevados de TNF- α causam resistência à insulina nos hepatócitos, levando ao aumento da gliconeogênese e lipogênese, resultando em esteatose (acúmulo de gordura no fígado). O aumento do nível de TNF- α também causa alterações mitocondriais, reduzindo a síntese eficiente de ATP e ativando a cascata de apoptose, aumentando os níveis de ATP glicolítico.

A resistência à insulina nos hepatócitos foi relatada apenas na infecção por dengue. Acredita-se que a redução do IRS-2 na esteatose hepática contribua para o comprometimento da sinalização da insulina relacionada à supressão da produção de glicose pelo fígado. Sabe-se também que a secreção de TNF- α induzida pela dengue regula negativamente o IRS-1 (o primeiro substrato do receptor de insulina), contribuindo para o aumento da resistência à insulina nos hepatócitos (LIU et al., 2022).

A liberação das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) e a elevação dos níveis de bilirrubina total na corrente sanguínea são desencadeadas por lesão hepatocelular (LALA et al., 2022), detectada devido a infecções por ZKV e YFV (XIAO et al., 2003; CHEN et al., 2004; PAES et al., 2005; TAN et al., 2010, 2011). Altas quantidades de aminotransferases são encontradas no citosol dos hepatócitos (com exceção da AST, que também está presente em outros órgãos e nas mitocôndrias) e bilirrubina no retículo endoplasmático liso. Quando ocorre lesão celular, as aminotransferases vazam para a corrente sanguínea, portanto, seus níveis mais altos nos exames de sangue indicam lesão. Não foi encontrado padrão para os níveis de AST e

ALT nem para o modelo animal nem para a via de administração do vírus utilizada, com os valores observados variando de 35 u/L a 900 u/L. Os níveis de AST são frequentemente superiores aos níveis de ALT, provavelmente devido aos danos que ocorrem no fígado, coração e rim simultaneamente, bem como como consequência da alteração de sua produção nas mitocôndrias e como subproduto da lipogênese.

Não há explicações sobre o mecanismo de ação do ZKV no fígado e poucos estudos analisam essa relação. Nesta revisão, descrevemos a inflamação e os danos hepáticos causados pelo ZKV, no entanto, são necessários mais estudos para entender seus efeitos hepatotóxicos, uma vez que sua ação no fígado já está comprovada (MACNAMARA, 1954; SHERMAN et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

5 CONCLUSÃO

Esta revisão mostrou que o fígado é um órgão altamente afetado por infecções causadas por dengue, febre amarela e zika vírus. Em geral, a infecção por flavivírus provoca um aumento nas citocinas pró-inflamatórias, o que leva a alterações estruturais nas mitocôndrias que ativam cascatas de morte celular e promovem a resistência à insulina. Essa condição inflamatória, juntamente com o aumento dos níveis de NO, aumenta a permeabilidade das células endoteliais, levando a alterações microestruturais no fígado, como esteatose, hemorragia, necrose, congestão vascular e subsequente dano à funcionalidade hepática. Contudo, os estudos estão focados principalmente nos vírus da dengue e da febre amarela, sendo os resultados relacionados à exposição ao zika vírus ainda incipientes.

6 REFERÊNCIAS

- AN J, KIMURA-KURODA J, HIRABAYASHI Y, et al. Development of a Novel Mouse Model for Dengue Virus Infection. *Virology*, v. 263, n.1, p. 70–77, 1999. doi: 10.1006/viro.1999.9887.
- ANWAR, M.N, AKHTAR, R, ABID, M. et al. The interactions of flaviviruses with cellular receptors: implications for virus entry. *Virology*, v. 568, p. 77–85, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.02.001>.
- ARAÚJO TVB, XIMENES RA de A, MIRANDA-FILHO D de B, et al. Association between Microcephaly, Zika Virus Infection, and Other Risk Factors in Brazil: Final

- Report of a Case-Control Study. **Lancet Infect Dis**, v. 18, p. 328–336, 2018. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30727-2.
- BAILEY AL, Kang LI, et al. Consumptive Coagulopathy of Severe Yellow Fever Occurs Independently of Hepatocellular Tropism and Massive Hepatic Injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 117, n.51, p. 32648–32656, 2020. doi: 10.1073/pnas.2014096117.
- BARTH OM, BARRETO DF, PAES M V, et al. Morphological Studies in a Model for Dengue-2 Virus Infection in Mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, n.8, p. 905–915, 2006; doi: 10.1590/s0074-02762006000800014.
- BRIANT L, DESPRÈS P, CHOUMET V, et al. Role of Skin Immune Cells on the Host Susceptibility to Mosquito-Borne Viruses. **Virology**, v. 464, n1, p. 26–32, 2014. doi: 10.1016/j.virol.2014.06.023
- BOONPUCKNAVIG S, VUTTIVIROJ O AND BOONPUCKNAVIG V. Infection of Young Adult Mice with Dengue Virus Type 2. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 75, n.5, p.647–653, 1981. doi: 10.1016/0035-9203(81)90142-5.
- CHATEL-CHAIX L AND BARTENSCHLAGER R. A Monocytic Detour to Replicate Patient-Derived Hepatitis C Virus in Hepatoma Cells and Its Use for Phenotypic Analyses. **Hepatology**, v. 61, n.4, p. 1112–1114, 2015. doi: 10.1002/hep.27614.
- CHEN HC, LAI SY, SUNG JM, et al. Lymphocyte Activation and Hepatic Cellular Infiltration in Immunocompetent Mice Infected by Dengue Virus. **J Med Virol**, v.73, n.3, p.419–431, 2004. doi: 10.1002/jmv.20108.
- DAEP CA, MUÑOZ-JORDÁN JL AND EUGENIN EA. Flaviviruses, an Expanding Threat in Public Health: Focus on Dengue, West Nile, and Japanese Encephalitis Virus. **J Neurovirol**, v.20, n.6, p. 539–560, 2014; doi: 10.1007/s13365-014-0285-z.
- DUAN T, JIANG HY, SONG B, et al. Noninvasive Imaging of Hepatic Dysfunction: A State-of-the-Art Review. **World J Gastroenterol**, v. 28, n.16, p. 1625–1640, 2022. doi: 10.3748/wjg.v28.i16.1625.
- EL-BACHA T, MIDDLEJ V, PEREIRA DA SILVA AP, et al. Mitochondrial and Bioenergetic Dysfunction in Human Hepatic Cells Infected with Dengue 2 Virus. **Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis**, v. 1772, n.10, p.1158–1166, 2007. doi:10.1016/j.bbadis.2007.08.003.
- FRANK, J.C., SONG, B.H., LEE, Y.M., et al. Mice as an animal model for Japanese encephalitis virus research: mouse susceptibility, infection route, and viral pathogenesis. **Pathogens**, v.12, n.5, 2023.https://doi.org/10.3390/pathogens12050715.

- GEERLING E, STEFFEN TL, BRIEN JD, et al. Current Flavivirus Research Important for Vaccine Development. **Vaccines**, v.8, n.3, p.1–5, 2020. doi: 10.3390/vaccines8030477.
- GOODFELLOW FT, TESLA B, SIMCHICK G, ET AL. Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. **Stem Cells Dev**, v.25, n.22, p.1691–1697, 2016. doi: 10.1089/scd.2016.023.
- HOOIJMANS CR, ROVERS MM, DE VRIES RBM, ET al. SYRCLE's Risk of Bias Tool for Animal Studies. **BMC Med Res Methodol**, v.14, n.1, p.1–9, 2014. doi: 10.1186/1471-2288-14-43.
- HOTTA H, MURAKAMI I, MIYASAKI K, et al. Inoculation of Dengue Virus into Nude Mice. **Journal of General Virology**, v.52, n.1, p.71–76, 1981. doi: 10.1099/0022-1317-52-1-71.
- KOH, C., HENRION-LACRITICK, A., FRANGEUL, L, et al. Interactions of the insect-specific palm creek virus with Zika and chikungunya viruses in *Aedes* mosquitoes. **Microorganisms**, v.9, n.8, p.1652, 2021. https://doi.org/10.3390/microorganisms9081652.
- KUROSAKI M, HOSOKAWA T, MATSUNAGA K, et al. Hepatic Steatosis in Chronic Hepatitis C Is a Significant Risk Factor for Developing Hepatocellular Carcinoma Independent of Age, Sex, Obesity, Fibrosis Stage and Response to Interferon Therapy. **Hepatol Res**, v.40, n.9, p. 870–877, 2010. doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00692.x.
- KUO, C., TAI, D., CHANG-CHIEN, C., et al. Liver Biochemical Tests and Dengue Fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.47, n.3, p. 265-270, 1992. doi: [10.4269/ajtmh.1992.47.265](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.265).
- LALA, V, GOYAL, A, BANSAL, P, ET al. Liver function tests. **StatPearls** 2021.
- LIU X, LIANG Z, DUAN H, ET al. Dengue Virus Is Involved in Insulin Resistance via the Downregulation of IRS-1 by Inducing TNF- α Secretion. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v.1868, n.10, 2022. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166472.
- MACNAMARA, F.N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, n.48, v.2, p.139-45, 1954. doi: 10.1016/0035-9203(54)90006-1.
- MCARTHUR MA, XIAO SY AND BARRETT AD. Phenotypic and Molecular Characterization of a Non-Lethal, Hamster-Viscerotropic Strain of Yellow Fever Virus. **Virus Res**, v.110, p. 65–71, 2005. doi: 10.1016/j.virusres.2005.01.004.

METHLEY AM, CAMPBELL S, CHEW-GRAHAM C, et al. PICO, PICOS and SPIDER: A Comparison Study of Specificity and Sensitivity in Three Search Tools for Qualitative Systematic Reviews. **BMC Health Serv Res**, v.14, n.1, 2014. doi: 10.1186/s12913-014-0579-0.

NADEEM, M., TAFADER, A., MARKLEY, J.D., et al., Liver manifestations of tick-borne diseases. **Clin. Liver Dis**, v.21, n.4, p.111–116, 2023. <https://doi.org/10.1097/CLD.000000000000025>. [9] L.E.

NASSIR F, RECTOR RS, HAMMOUD GM, et al. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterol Hepatol**, v.11, n.3, p.167–175, 2015.

NDUMELE CE, ET AL. Hepatic steatosis, obesity, and the metabolic syndrome are independently and additively associated with increased systemic inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.31, n.8, p.1927-1932, 2011. doi:10.1161/ATVBAHA.111.228262

NICOLLE, A. GUTKIN, G. SMART, et al., Serological studies of West Nile virus in a liver transplant population, **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol**, v. 15, p.271–274, 2004. <https://doi.org/10.1155/2004/606015>.

FRANÇA RFO, ZUCOLOTO S AND ANTÔNIO LOPES DA Fonseca B. A BALB/c Mouse Model Shows That Liver Involvement in Dengue Disease Is Immune-Mediated. **Exp Mol Pathol**, v.89, n.3, p.321–326, 2010. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.07.007.

PAES M V, LENZI HL, NOGUEIRA AC, et al. Hepatic Damage Associated with Dengue-2 Virus Replication in Liver Cells of BALB/c Mice. **Lab Invest**, v. 89, n.10, p.1140–1151, 2009. doi: 10.1038/labinvest.2009.83.

PAES M V., PINHÃO AT, BARRETO DF, et al. Liver Injury and Viremia in Mice Infected with Dengue-2 Virus. **Virology**, v.338, n.2, 236–246, 2005. doi: 10.1016/j.virol.2005.04.042.

PAIXÃO ES, TEIXEIRA MG, COSTA M DA CN, ET AL. Dengue during Pregnancy and Adverse Fetal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Lancet Infect Dis**, v.16, n.7, p.857–865, 2016. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00088-8.

PIERSON TC AND DIAMOND MS. The Continued Emerging Threat of Flaviviruses. **Nature microbiology**, v.5, n.6, p. 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>

PIERSON TC AND KIELIAN M. Flaviviruses: Braking the Entering. **Curr Opin Virol**, v.3, n.1, p.3–12, 2013. doi: 10.1016/j.coviro.2012.12.001.

RODHAIN F. Yellow Fever: A Brief History of a Tropical Virosis. **Press Medicale**, v.51, n.3, p.104132, 2022. doi: 10.1016/j.lpm.2022.104132.

SAKINAH S, PRIYA SP, KUMARI S, et al. Impact of Dengue Virus (Serotype DENV-2) Infection on Liver of BALB/c Mice: A Histopathological Analysis. **Tissue Cell**, v.49, n.1, p.86–94, 2017. doi: 10.1016/j.tice.2016.11.005.

SAMANTA J AND SHARMA V. Dengue and Its Effects on Liver. **World J Clin Cases**, v.3, n.2, p.125, 2015. doi: 10.12998/wjcc.v3.i2.125.

SAMSA MM, MONDOTTE JA, IGLESIAS NG, et al. Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. **PLoS Pathog**, v.5, n.10, 2009. doi: 10.1371/journal.ppat.1000632.

SCHUL W, LIU W, XU HY, ET AL. A Dengue Fever Viremia Model in Mice Shows Reduction in Viral Replication and Suppression of the Inflammatory Response after Treatment with Antiviral Drugs. **J Infect Dis**, v.195, n.5, p.665–674, 2007. doi: 10.1086/511310.

SHASTRI AA, SALEH A, SAVAGE JE, et al. Dietary Alterations Modulate the MicroRNA 29/30 and IGF-1/AKT Signaling Axis in Breast Cancer Liver Metastasis. **Nutr Metab**, v.17, n.1, p.1–8, 2020. doi: 10.1186/s12986-020-00437-z.

SHARMA S, JAIN S AND Rajaram S. Spectrum of Maternofetal Outcomes during Dengue Infection in Pregnancy: Na Insight. **Infect Dis Obstet Gynecol**, p.10–13, 2016. doi: 10.1155/2016/5046091

SHERMAN KE, ROUSTER SD, KONG LX, ET al. Zika Virus Replication and Cytopathic Effects in Liver Cells. **PLoS One**, v.14, n.3, p.1–11, 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0214016.

SHRESTA S, SHARAR KL, PRIGOZHIN DM, et al. Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. **J Virol**, v.80, n.20, p.10208–10217, 2006. doi: 10.1128/jvi.00062-06.

SUNG JM, LEE CK AND WU-HSIEH BA. Intrahepatic Infiltrating NK and CD8 T Cells Cause Liver Cell Death in Different Phases of Dengue Virus Infection. **PLoS One**, v.7, n.9, p.46292, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046292.

TAN GK, NG JKW, TRASTI SL, ET al. A Non Mouse-Adapted Dengue Virus Strain as a New Model of Severe Dengue Infection in AG129 Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.4, p.1–10, 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000672.

TAN GKX, NG JKW, LIM AHY, et al. Subcutaneous Infection with Non-Mouse Adapted Dengue Virus D2Y98P Strain Induces Systemic Vascular Leakage in AG129

- Mice. **Ann Acad Med Singap**, v.40, n.12, p.523–532, 2011. doi: 10.47102/annals-acadmedsg.v40n12p523.
- VAN LEUR SW, HEUNIS T, MUNNUR D, ET al. Pathogenesis and Virulence of Flavivirus Infections. **Virulence**, v.12, n.1, p.2814–2838, 2021. doi: 10.1080/21505594.2021.1996059.
- WIN MM, CHARNGKAEW K, PUNYADEE N, ET AL. Ultrastructural Features of Human Liver Specimens from Patients Who Died of Dengue Hemorrhagic Fever. **Trop Med Infect Dis**, v.4, n.2, 2019. doi: 10.3390/tropicalmed4020063.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. **World Health Organization**, 1986.
- WU Y, CUI X, WU N, ET AL. A Unique Case of Human Zika Virus Infection in Association with Severe Liver Injury and Coagulation Disorders. **Sci Rep**, v.7, n.1, p.1–8, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-11568-4.
- XIAO SY, GUZMAN H, DA ROSA A, ET AL. Alteration of Clinical Outcome and Histopathology of Yellow Fever Virus Infection in a Hamster Model by Previous Infection with Heterologous Flaviviruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.6, p.695–703, 2003. doi: 10.4269/ajtmh.2003.68.695.
- YOON JH, LEE JM, YU MH, et al. Simultaneous Evaluation of Perfusion and Morphology Using GRASP MRI in Hepatic Fibrosis. **Eur Radiol**, v.32, n.1, p.34–45, 2022. doi: 10.1007/s00330-021-08087-2.
- ZELLWEGER RM, PRESTWOOD TR AND SHRESTA S. Antibodies Enhance Infection of LSECs in a Model of ADE-Induced Severe Dengue Disease. **Cell Host Microbe**, v.7, n.2, p.128–139, 2010. doi: 10.1016/j.chom.2010.01.004. Antibodies.
- ZHANG Y, CORVER J, CHIPMAN PR, et al. Kuhn Str of Immature Flaviviruses. **Embo**, v.22, n.11, 2003.
- ZHANG Z, SUN M, DENG J, et al. Zika Virus Induced More Severe Inflammatory Response than Dengue Virus in Chicken Embryonic Livers. **Front Microbiol**, v.10, p.1–9, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01127.

CAPÍTULO 2

Desregulação funcional, oxidativa e estrutural hepática causada pela associação da hiperglicemia com a infecção por ZIKV em camundongos BALB/c

1 INTRODUÇÃO

O fígado desempenha papéis vitais, incluindo o metabolismo de macronutrientes, suporte imunológico e regulação do volume sanguíneo, envolvendo diferentes tipos celulares como hepatócitos, células epiteliais biliares, células estreladas e células de Küpffer. Danos ao fígado ativam células estreladas, desencadeando cicatrização que, se repetida, pode levar à cirrose e consequentemente insuficiência hepática. O órgão também armazena glicose como glicogênio, regulando os níveis de glicose no sangue durante o jejum (KUMAR et al., 2013; TREFTS et al., 2018).

Preocupações surgem devido ao impacto da alimentação excessiva na resistência à insulina no fígado, correlacionando-se com o diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e síndrome metabólica. A resistência hepática à insulina contribui para o aumento da glicose no sangue e estimula a lipogênese (BECHMANN et al., 2012; TREFTS et al., 2018). O diabetes mellitus (DM), um problema de saúde pública associado à obesidade, resistência à insulina e produção reduzida, é marcante na DHGNA. A prevalência de diabetes é notável em pacientes com doenças hepáticas crônicas, hepatite e cirrose, sugerindo seu papel de progressão da lesão hepática, visto que existe uma relação mútua de piora no quadro de ambas as condições. (MENTHA et al., 2000; HUI et al., 2003; HICKMAN et al., 2003; RATZIU et al., 2003; TAURA et al., 2006; HICKMAN et al., 2007; HOU et al., 2022).

O Zika vírus (ZIKV), da família Flaviviridae, é transmitido principalmente pela picada do mosquito *Aedes*. Sua patogênese sugere disseminação próxima aos gânglios linfáticos e circulação sistêmica. Até 2007, pouco estudado, o ZIKV ganhou visibilidade após infecções em Ilhas Yap, Japão e França. Em 2015, o Brasil notificou casos, associando a rápida globalização à possível introdução do vírus durante a Copa do Mundo de 2014. A contaminação por ZIKV pode resultar em aborto, malformações fetais e sequelas no bebê, como deficiências visual, auditiva e microcefalia (PERGOLIZZI et al., 2021; ZHANG et al., 2019; SHERMAN et al., 2019, SALVADOR; FUJITA, 2015).

Devido aos impactos graves da microcefalia causada pelo ZIKV em fetos, a pesquisa concentrou-se no desenvolvimento neural, com escassez de dados sobre o efeito da infecção em outros sistemas (ZHANG et al., 2019). Estudos *in vitro* indicam que os hepatócitos são suscetíveis à replicação viral (SHERMAN et al., 2019), e a citotoxicidade resultante da infecção pelo ZIKV nos hepatócitos limita a produção do vírus. Esse padrão de citotoxicidade é consistente com observações em hepatite viral, compartilhando estruturas homólogas ao vírus da hepatite C, conhecido como hepacivírus (SIMMONDS

et al., 2017). O ZIKV pode agir semelhante à Dengue, e infecções virais que aumentam o glicogênio hepático, possivelmente relacionado à deficiência da enzima glicose-6-fosfatase G6P, responsável pela conversão do glicogênio em glicose. A diminuição nos níveis dessa enzima pode contribuir para o acúmulo de glicogênio no fígado (MACIEL et al., 2012; GUEDES, MELO, 2019).

Então, este trabalho tem como propósito analisar as alterações hepática causadas pelo zika vírus e sua associação com diabetes mellitus para melhor compreensão da sua patologia e gravidade associada à doença crônica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e caracterização do biotério

Vinte e quatro machos da linhagem BALB/c em idade reprodutiva (10-12 semanas; 25-30g) foram utilizados a partir da sua obtenção no biotério do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ/PE) e permaneceram no biotério NB2 do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) durante a fase experimental. A execução do projeto foi realizada de acordo com as normas impostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE e do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz-PE) (Anexo 1, protocolo nº 76/2020) com distribuição dos animais em estantes ventiladas (ALESCO®), microisoladores (n=5/gaiola), dieta (Labina®), água filtrada *ad libitum*, temperatura e iluminação controladas (22±2°C, 12h claro/12h escuro).

2.2. Grupos experimentais

Quatro grupos (n=6 animais por grupo) foram formados pela distribuição dos camundongos, sendo eles: controle (C), diabético (D), grupo infectado com ZIKV (Z) e grupo diabético + ZIKV (DZ). A eutanásia dos animais ocorreu aos 28 dias pós infecção.

2.3. Indução do diabetes

Os animais receberam injeção intraperitoneal de 150mg/kg (0,1ml) de estreptozotocina dissolvida em 0,1 M de tampão citrato, pH 4,5 aos 60 dias de idade ou

com peso aproximado de 28g. O processo de indução foi feito segundo Madhu et al. (2014).

2.4. *Imunodepressão farmacológica*

A imunodepressão foi induzida via intraperitoneal de Dexametasona (FARMADEX®, 50mg/kg/dia) durante 3 dias pré-infecção e por mais 9 dias pós-infecção de acordo com o protocolo realizado por Chan et al (2016). (Dados do efeito da dexametasona encontram-se na tabela suplementar S1)

2.5. *Infecção pelo vírus Zika*

Os camundongos selecionados (os que obtiveram confirmação do diabetes por exame rápido de glicemia com sangue retirado da cauda, com valores superiores a 200mg/dl) foram tratados com dexametasona durante 3 dias seguidos e após isso, receberam o ZIKV (ZIKV PE243) via intraperitoneal (IP) na concentração de 1×10^4 PFU suspensos em 200 μ L de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina). Posteriormente à infecção, a dexametasona foi aplicada por mais 9 dias com o propósito de manter a infecção.

2.6. *Coleta de órgãos*

Os animais foram sedados e anestesiados por via intramuscular utilizando-se cloridrato de xilazina (10mg/kg/IM) e cloridrato de cetamina (115mg/kg/IM). Após isso, foram submetidos ao anestésico tiopental sódico (50mg/kg/IP). Após confirmação da anestesia, os camundongos foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte) e eutanasiados. O sangue foi coletado por meio de punção cardíaca e centrifugado a 4.119G por 15 minutos (4°C) para obtenção do soro, que foi armazenado à -80°C para posterior dosagens de bioquímica sérica, análise de RNA viral e detecção viral. Em seguida, foi realizada a abertura da cavidade abdominal a partir de incisão na linha alba, para a dissecação e a remoção do fígado, pesado e fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 4%, 1:1 em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7.4) por 24 horas, sendo posteriormente transferido para o etanol 70%, para o processamento

histológico. Fragmentos do fígado foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para análise de estresse oxidativo.

Os fragmentos hepáticos foram desidratados em soluções crescentes de etanol e incluídos em hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Seções semi seriadas de 3 μ m em intervalos de, no mínimo, 40 μ m entre os cortes foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany).

2.7. *Biometria corporal e hepática*

Os camundongos foram pesados ao longo do experimento. Calculou-se a variação de peso corporal (PC) à partir da subtração do peso corporal final pelo inicial. Foi calculado também o índice hepatossomático (IHS) pela relação entre o peso do fígado (PF) e o peso corporal final (PCf), sendo $IHS (\%) = PF/PCf \times 100$. O lóbulo hepático do material já fixado foi retirado para determinar o volume do fígado. Em seguida, foi pesado em balança analítica e depois depositado em proveta milimetrada contendo 1 mL de água, presenciando a precipitação da água dentro da proveta. Essa precipitação foi denominada de volume ocupado pelo lóbulo (VL) e o valor obtido foi utilizado para o cálculo do volume total do órgão (VF), sendo $VF = VL \times PF/PL$, onde PF= peso do fígado e PL= peso do lóbulo. Através da fórmula $d = m/v$ (m=massa; v=volume) foi obtida a densidade (d) do fígado.

2.8. *Estresse oxidativo*

Foi realizada a avaliação da atividade catalase (CAT) pelo método descrito por AEBI (1984), onde a taxa de decomposição de H₂O₂ é medida. A partir do método da Xantina oxidase foi avaliado a atividade da superóxido dismutase (SOD), baseado na produção de H₂O₂ e redução do nitroblue tetrazolium (SARBAN et al., 2005). Já os níveis de malondialdeído (MDA) foram determinados utilizando-se solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO). A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida nos órgãos homogeneizados para avaliar o

estado oxidativo nas células através da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (WALLIN et al., 1993).

A capacidade antioxidante total (FRAP) (Benzie & Strain, 1996). Os níveis de NO sobrenadante foram medidos indiretamente pela quantificação dos níveis de nitrito/nitrato nos fígados de acordo com a metodologia de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). Os níveis de proteína totais foram medidos usando curva de albumina bovina pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), e usada para normalizar os dados.

2.9. Análise de danos ao fígado

As amostras de sangue foram centrifugadas a 4600 rpm por 20 min a 4°C. O soro foi coletado para avaliação dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), dois biomarcadores funcionais de lesão hepática. As análises foram realizadas utilizando-se kits bioquímicos (Bioclin Laboratories) adequados para o analisador químico BS-200E (Bioclin Laboratories, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante.

2.10. Quantificação bioquímica

O soro dos camundongos foi usado para determinação dos níveis de glicose, albumina, colesterol, lactato, gama GT, fosfatase alcalina, e LDH (lactato desidrogenase). Os testes foram realizados com kits da Bioclin® (Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

2.11. Definição de titulação viral em amostras de soro

A titulação viral foi realizada pelo método padrão TCID₅₀ e foi expressa como log₁₀ TCID₅₀/mL. Para isso, as células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 10.104 células/poço a 37°C em uma incubadora de CO₂ a 5% um dia antes da titulação. O soro de camundongos armazenado foi diluído em série 10 vezes em DMEM e adicionado às células, que foram posteriormente incubadas por 3 ou 5 dias a 37°C e 5% de CO₂. O efeito citopático foi avaliado em microscópio óptico invertido. A redução do título viral foi expressa como log₁₀ TCID₅₀/mL.

2.12. ZIKV RT – qPCR – Detecção do Zika vírus

A RT-PCR em tempo real foi realizada conforme descrito anteriormente (Magalhães et al. 2017) para detecção do vírus, utilizando os primers: FWD: (AAGCAAAAGGTAGCCGCGCC-3') e RWD: (5' - TGTCAGCCAGCAGTGTCA-3'), e sonda TAQMAN FAM. Os primers e a sonda utilizados no multiplex RT-qPCR foram sintetizados pela Thermo Fisher. O protocolo experimental de RT-qPCR foi o seguinte: etapa de transcrição reversa a 45 °C por 15 min, uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida por 45 ciclos de 95 °C por 5 s e uma etapa de extensão de recozimento em 60°C por 45s. O RT-qPCR foi testado em um sistema QuantiStudio 5 (Applied BioSystems) e os resultados foram analisados usando o software QuantiStudio Design and Analysis 1.3.1 (Thermo Fisher Scientific) com limiar e linha de base automáticos. As amostras que resultaram em valores de C_q (Quantificação do Ciclo) ≤ 38,5 em ambas as duplicatas foram consideradas positivas. Todas as amostras foram testadas em duplicatas, utilizando dois controles negativos (todos os reagentes exceto RNA e controle negativo da extração de RNA), controles positivos (RNA de soro infectado com ZIKV) e uma curva padrão que consiste em uma diluição em série de transcrito de RNA previamente quantificado. A transcrição *in vitro* foi realizada utilizando o kit MEGAscript T7 (Ambion). A curva padrão foi quantificada no Nanodrop 2000 e a concentração de RNA foi convertida em número de cópias de RNA conforme descrito por Kong et al (2006).

2.13. Processamento histológico

As técnicas de coloração com Ácido Periódico Schiff (PAS) foram utilizadas para verificação de glicogênio das preparações histológicas; Hematoxilina e Eosina (HE) e Azul de Tuluidina para análises histopatológicas. Foram obtidas imagens digitais das preparações histológicas por meio do fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan).

Para cada grupo experimental, 20 campos foram selecionados para se obter a análise correspondente e foram quantificados com o auxílio do programa Image J® (National Institute of Health, USA).

2.14. Morfometria e estereologia hepáticas

Uma grade contendo 266 interseções foi projetada sobre 10 campos capturados ao acaso em objetiva de 20X (Olympus AX 70 TRF), obtendo-se no total 2660 pontos por animal. Os pontos coincidentes sobre o citoplasma e núcleo de hepatócitos, hepatócitos

binucleados, capilares sinusoides, células de Kupffer e vacúolos citoplasmáticos foram computados. O percentual de cada componente foi determinado pela fórmula: proporção volumétrica (%) = (número de pontos sobre cada componente hepático/2.660 pontos no total) x 100.

A obtenção do diâmetro nuclear médio dos hepatócitos foi realizada a partir da mensuração, ao acaso, de 30 núcleos esféricos com nucléolos evidentes. Através da fórmula ($VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear), foi encontrado o volume nuclear (VN).

2.15. Análises estatísticas

Por meio do teste de Shapiro-Wilk, os resultados foram submetidos para avaliação de normalidade. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Student Newman-Keuls (SNK). O software STATISTICA for WINDOWS 3.11 foi usado com o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$.

Além disso foi feita a análise de Componentes Principais (PCA) para identificar possíveis clusters, a fim de eliminar redundâncias e definir as variáveis mais importantes na separação de grupos. Os dados foram normalizados, sendo que o nível de importância de cada variável foi determinado pelos valores dos auto vetores (McGarigal et al., 2000). Portanto, valores de correlação substancial foram mostrados para cada atributo em componentes principais (PC) 1 e 2. O nível de importância de cada PC foi determinado pelo método de Broken-stick, onde os autovalores excederam o esperado foram mantidos para interpretação. Análises foram realizados utilizando o programa Fitopac 2.1.2.85 (Shepherd, 2010).

3 RESULTADOS

3.1 Biometria corporal e hepática

Após análise da biometria corporal com 28 dpi (dias pós-infecção, Tabela 4), foi constatado que houve diferença significativa entre o peso corporal inicial dos camundongos do grupo C e D (que apresentaram maiores pesos) com os grupos Z e DZ. Houve ganho de peso nos camundongos dos grupos controle e zika e perda de peso nos grupos diabéticos e diabéticos com zika vírus.

O grupo Z apresentou peso hepático significativamente maior em comparação ao controle (Tabela 4). Não houve diferenças significativas entre os grupos D e DZ em relação ao controle. A avaliação do índice hepatossomático (IHS) demonstrou IHS maior

nos grupos Z, D e DZ quando comparados com o grupo controle, indicando aumento relativo do peso do fígado em relação ao peso corporal. Os grupos D e DZ apresentaram volume de fígado significativamente maior em comparação com o C, sendo que o grupo DZ apresentou maior volume. Em relação à densidade do fígado, os grupos D e DZ demonstraram diminuição significativa entre os grupos C e Z e entre si. A respeito do conteúdo de água, os grupos Z, D e DZ apresentaram um valor significativamente maior em relação ao C, mas sem diferenças significativas entre si (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros biométricos de camundongos controle, diabéticos, infectados com ZIKV ou com associação de Diabetes e Infecção aos 28 dpi.

Parâmetros	Controle	ZIKV	Diabéticos	Diabéticos + ZIKV
Peso corporal inicial (g)	26,48 ± 1,61 ^a	23,72 ± 1,52 ^b	27,00 ± 3,46 ^a	25,33 ± 2,07 ^b
Peso corporal final (g)	30,67 ± 1,51 ^a	28,17 ± 0,98 ^a	23,17 ± 4,22 ^b	22,17 ± 1,17 ^b
Ganho de peso corporal (g)	4,19 ± 2,88 ^a	4,45 ± 2,02 ^a	-3,83 ± 2,23 ^b	-3,17 ± 2,56 ^b
Peso do fígado (g)	1,14 ± 0,13 ^b	1,56 ± 0,09 ^a	1,15 ± 0,11 ^b	1,26 ± 0,07 ^b
IHS (%)	4,56 ± 0,44 ^b	5,83 ± 0,65 ^a	5,08 ± 0,82 ^a	5,68 ± 0,56 ^a
Volume do fígado (mL)	1,45 ± 0,14 ^a	1,61 ± 0,15 ^a	1,96 ± 0,43 ^b	3,33 ± 1,55 ^c
Densidade do fígado (g/ mL)*	0,96 ± 0,08 ^a	0,97 ± 0,06 ^a	0,60 ± 0,10 ^b	0,43 ± 0,15 ^c
Conteúdo de água (mL /g)	31,98 ± 3,30 ^a	40,00 ± 3,00 ^b	47,27 ± 9,18 ^b	47,51 ± 5,89 ^b

IHS – índice hepatossomático. Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. ($n = 6$ animais/grupo). * Há interação entre ZIKV e diabetes de acordo com ANOVA two-way.

3.2 Estresse oxidativo

Os níveis de proteína carbonilada aumentaram no grupo Z, quando comparado aos demais grupos. Este mesmo parâmetro aumentou também nos grupos D e DZ quando comparado aos demais, contudo, os valores de proteína carbonilada entre D e DZ são semelhantes (Figura 4a). Os níveis de óxido nítrico (ON) e de malondialdeído (MDA) aumentaram nos grupos D e DZ em comparação com os demais (Figura 4 b,c). Não houve aumento significativo dos níveis de SOD (superóxido dismutase) em nenhum dos grupos tratados (Figura 4d). A atividade da CAT (catalase) aumentou apenas no grupo Zika (Figura 4e). Já os níveis de GST (glutathione transferase) diminuíram significativamente nos grupos Z e DZ (Figura 4f). Por fim, o FRAP (capacidade de redução férrica do plasma) houve diminuição significativa nos três grupos (Z, D e DZ) em relação ao grupo controle (Figura 4g).

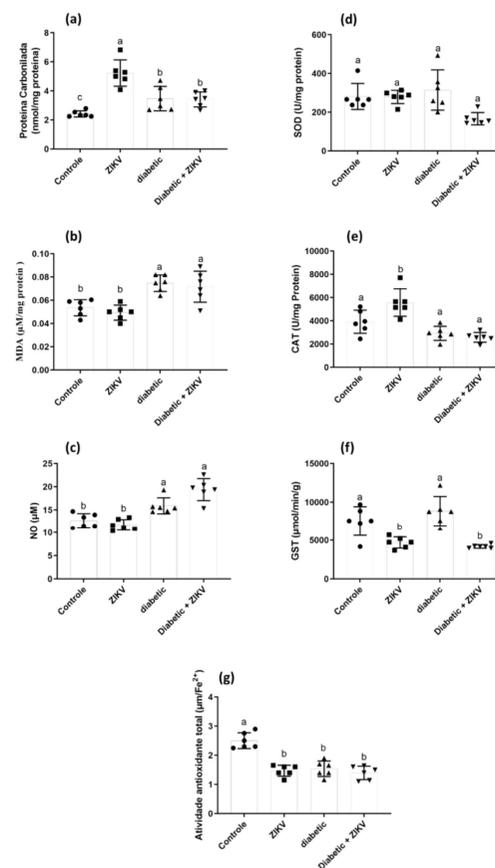


Figura 4. Atividades de enzimas antioxidantes e níveis de MDA e NO. Proteína carbonilada (Há interação entre ZIKV e diabetes de acordo com ANOVA two-way), Óxido nítrico (NO), Malondialdeído (MDA), Glutathione-S-transferase (GST), Capacidade antioxidante total (FRAP), Superóxido desmutase (SOD) e Catalase (CAT). Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. ($n = 6$ animais/grupo).

3.3 Análise de danos ao fígado

Ocorreu aumento de ALT nos grupos D e DZ, tendo a maior elevação nesse último grupo (Figura 5a). Os níveis de AST foram maiores três grupos tratados (Z, D e DZ) quando comparado ao grupo controle (Figura 5b).

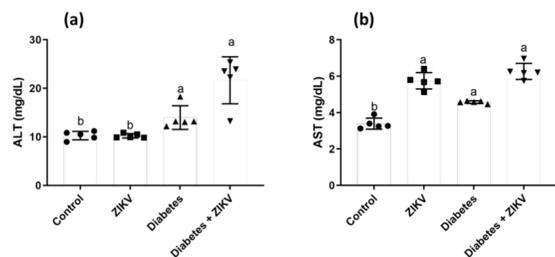


Figura 5. Níveis séricos de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase). Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo).

3.4 Glicemia

Os níveis de glicose séricos aumentaram em todos os três grupos tratados (Z, D e DZ) (Figura 6).

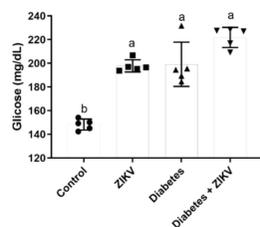


Figura 6. Níveis séricos de glicose (mg/dL). Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo).

3.5 Albumina

Houve diminuição nos níveis de albumina nos grupos Z em relação ao grupo controle (Figura 7).

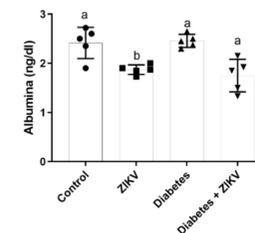


Figura 7. Níveis séricos de albumina (ng/dL). Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo).

3.6 Colesterol

Os níveis de colesterol total mantiveram-se semelhantes ao grupo controle nos camundongos com D e DZ, entretanto, aumentou significativamente no grupo infectado apenas com o ZIKV (Figura 8).

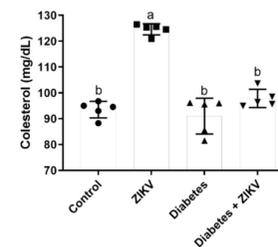


Figura 8. Níveis séricos de colesterol (mg/dL). Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo).

3.7 Gama GT

Os índices de Gama GT apresentaram aumento significativo nos grupos D e DZ em comparação aos grupos controle e Z (Figura 9).

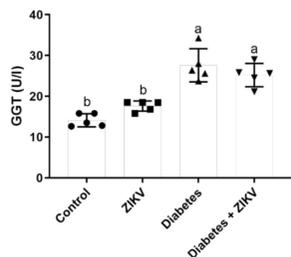


Figura 9. Níveis séricos de Gama GT (gamaglutamiltransferase, U/l). Média ± DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo).

3.8 Fosfatase alcalina

Os níveis de fosfatase alcalina aumentaram significativamente no grupo ZD, com relação ao controle. Por outro lado, o grupo Z apresentou valor menor que o controle (Figura 10).

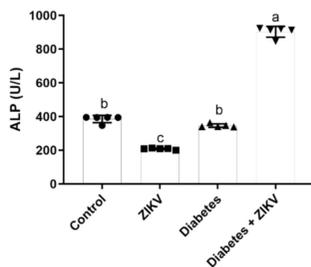


Figura 10. Níveis séricos de Fosfatase alcalina (U/L). Média ± DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo). Há interação entre ZIKV e diabetes de acordo com ANOVA two-way.

3.9 LDH

Houve diminuição dos níveis de lactato desidrogenase no grupo D e quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 11).

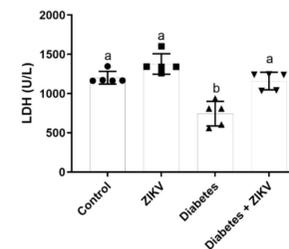


Figura 11. Níveis séricos de LDH (U/L). Média ± DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo).

3.10 Lactato

Ocorreu aumento dos níveis de lactato em todos os três grupos tratados em relação ao grupo controle (Figura 12).

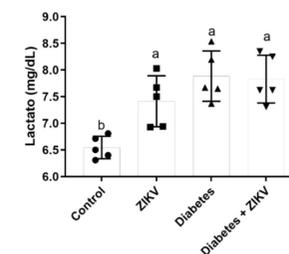


Figura 12. Níveis séricos de lactato (mg/dL). Média ± DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. (n = 6 animais/grupo).

3.11 Morfologia e morfometria hepáticas

Foram observadas variações na microestrutura hepática nos três grupos (Z, D e DZ). No grupo ZIKV houve dilatação dos capilares sinusoides, além de degeneração hidrópica, autólise e morte celular/infiltrado inflamatório. Nos grupos de diabetes e

diabetes com ZIKV foram observadas alterações como a degeneração hidrópica e morte celular/infiltrado inflamatório (Tabela 5; Figura 13).

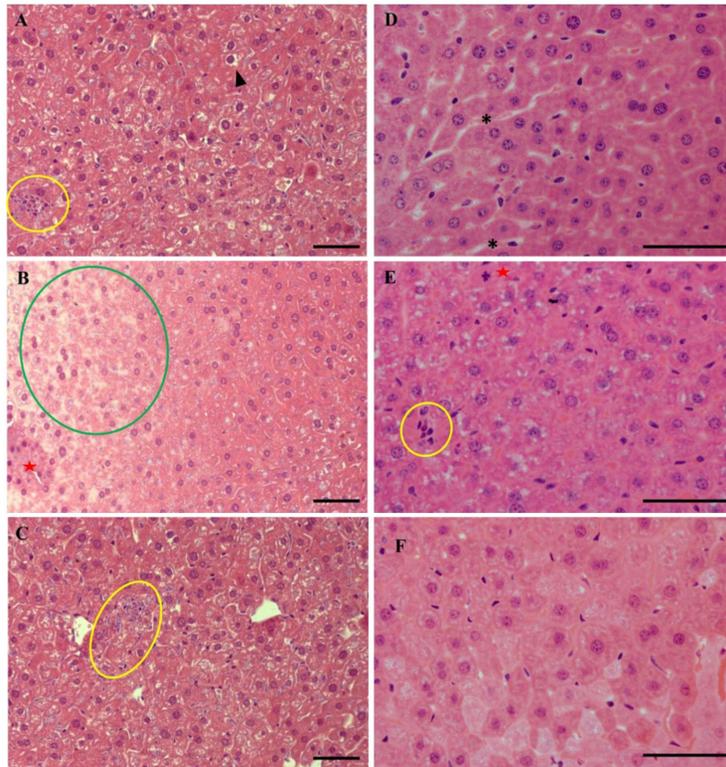


Figura 13: Fotomicrografia representativa das alterações teciduais encontradas nos grupos experimentais. Círculo amarelo – infiltrado inflamatório com morte celular; Círculo verde – autólise; estrela vermelha – morte celular; asterisco – dilatação de capilar sinusoidal. Coloração HE. Barra = 30µm

Tabela 5. Alterações morfológicas encontradas nos tecidos hepáticos corados com HE.

Grupo	Alterações
Controle	Não encontrada
Zika	Dilatação de capilares sinusoides Degeneração hidrópica Morte celular/ Infiltrado inflamatório
Diabetes	Degeneração hidrópica Morte celular/ Infiltrado inflamatório
Zika + Diabetes	Morte celular/ Infiltrado inflamatório Degeneração hidrópica

Em relação à morfometria hepática, foram encontradas diferenças significativas apenas na quantidade de hepatócitos mononucleados e trinucleados no grupo diabético que estavam aumentados em relação ao grupo controle nos grupos diabético e diabético com ZIKV (Figura 14).

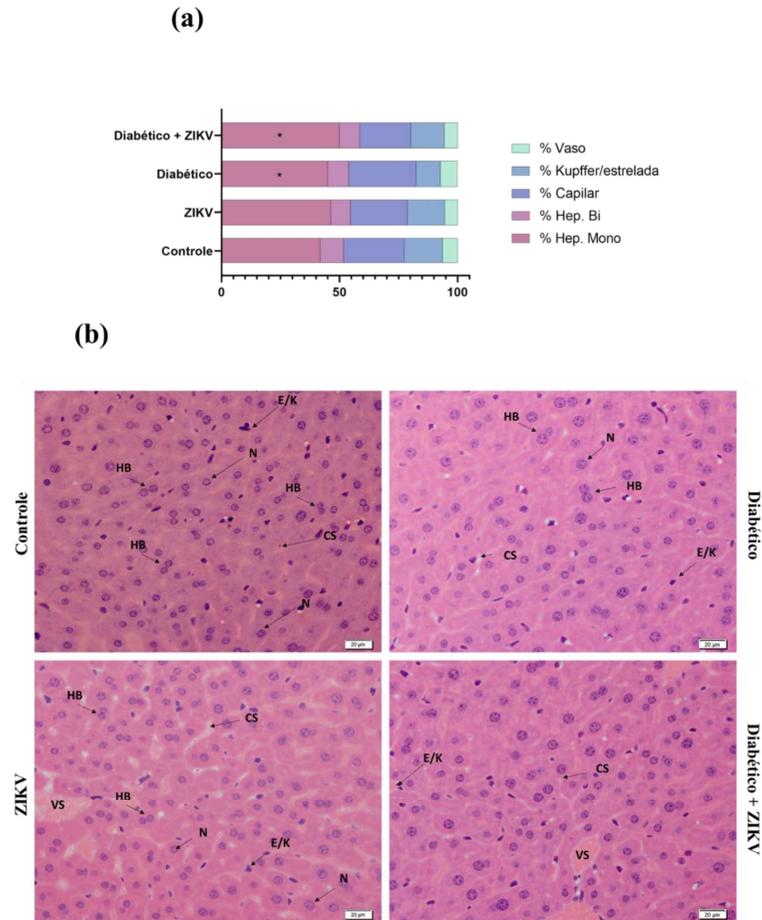


Figura 14. Análise dos componentes hepáticos. A - Proporção dos componentes hepáticos; B- fotomicrografia hepática representativa dos grupos experimentais. Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. ($n = 6$ animais/grupo). Coloração HE. Barra = $20\mu\text{m}$. HB- hepatócitos binucleados; CS- capilar sinusoide; N- núcleo; E/K-células estreladas ou de Kupffer; VS- vaso sanguíneo.

Não houve alterações significativas dos diâmetros nucleares entre todos os grupos (Figura 15).

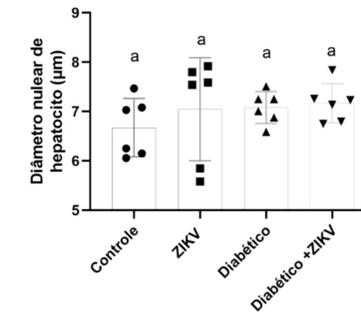


Figura 15. Diâmetro nuclear de hepatócitos. Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. ($n = 5$ animais/grupo).

3.12 Glicogênio hepático

Os níveis de glicogênio aumentaram nos grupos ZIKV e diabético em relação ao grupo controle (Figura 16).

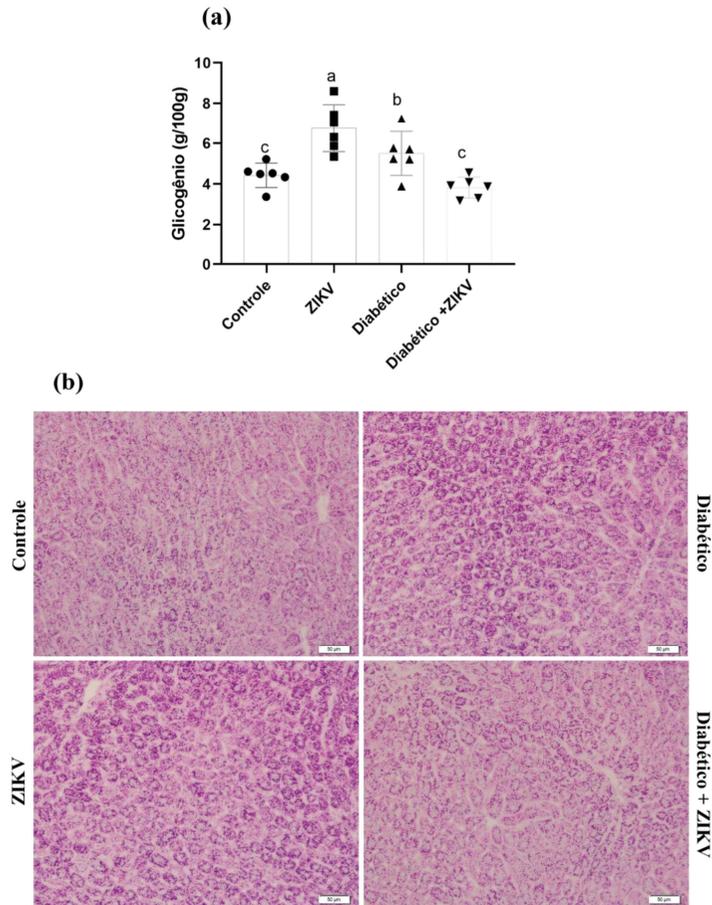


Figura 16. Análise histológica e bioquímica de glicogênio hepático. A - Quantidade de glicogênio por 100 mg de tecido hepático; B – Fotomicrografia do fígado evidenciando a presença de inclusões citoplasmáticas de glicogênio (coloração PAS). Média \pm DP. a,b Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, ZIKV, diabético e Diabético + ZIKV pela ANOVA two-way. ($n = 5$ animais/grupo). Há interação entre ZIKV e diabetes de acordo com ANOVA two-way. Barra = 20 μ m

3.13 Atividade viral

A atividade viral foi encontrada apenas no grupo diabético infectado com zika vírus com 28 dpi (Figuras 17 e 18).

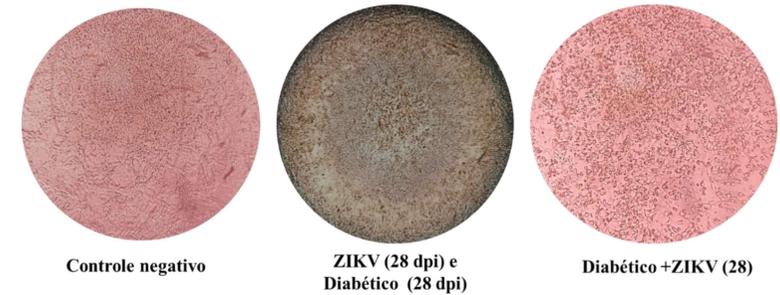


Figura 17: Efeito citopático induzido por ZIKV em células Vero após 5 dias após a infecção (3 dpi) com soro de camundongo. Controle negativo (corresponde a células não infectadas tratadas apenas com DMEM).

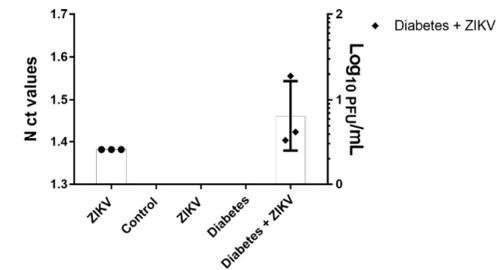


Figura 18. Rendimento de RNA do ZIKV no soro de camundongos. Os animais foram infectados com uma Multiplicidade de Infecção (MOI) de 0,1 de ZIKV. O soro foi coletado e o valor ct determinado por PCR de transcrição reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Análises equivalentes de PFU foram realizadas para obter o título viral. Os resultados são expressos como média \pm DP de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

3.14 Análise de componente principal

A variação total contida nos dois principais componentes (PC1 e PC2) foi de 83,5%, sendo que os atributos mais importantes na distinção do grupo apresentaram valores de correlação $> 0,6$ (Figura 19). Para PC1 (eixo horizontal) os atributos mais relevantes e seus respectivos valores de correlação foram: Peso final (-0,2063); Ganho de peso (-0,2020); peso fígado (-0,1676); %agua (0,1838); densidade (-0,2219); volume fígado (0,2103); albumina (0,2030); ALT (0,2226); AST (0,1872); Colesterol (0,1895); lactato (0,2084); Gama GT (0,1953); fosfatase alcalina (0,1930); SOD (0,1998); CAT (-0,1816); FRAP (0,1652); NO (0,2003); MDA (0,1918); % Hep. Mono (0,2004); % Hep. Bi (0,1745); % Vaso (0,1449); % Hep. Sem núcleo (-0,2155); DNH (0,1543).

No PC2 (eixo vertical), os tratamentos foram separados principalmente por peso fígado (0,2157); IHS (0,2216); LDH (0,2423); % Hep. Trinucleado (-0,2734); % Capilar (-0,2845); % Kupffer/estrelada (0,2967); % Vaso (-0,2481). Ficando evidente 4 grupos separados: controles, infectados com ZIKV, Diabéticos e associação.

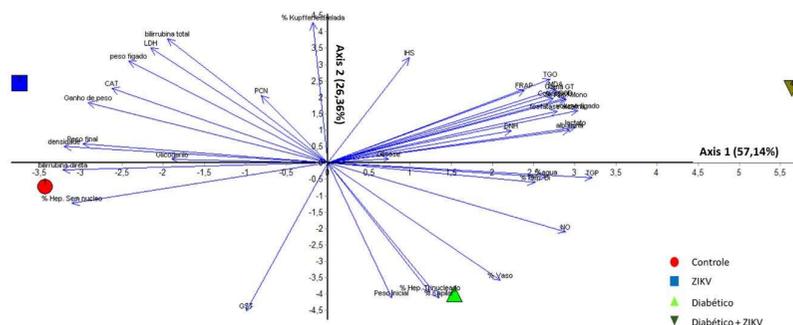


Figura 19: Análise de componente principal. Círculo – controle negativo; quadrado infectado por ZIKV; triângulo – Diabético e triângulo invertido – Diabético + ZIKV

4. DISCUSSÃO

A relação entre o Zika vírus e o seu efeito no fígado já foram relatados em estudos sobre sua replicação nos hepatócitos, além de casos descritos com icterícias e alterações hepáticas encontradas em humanos, resultado da infecção do Zika com inflamação, esteatose e necrose (MACNAMARA, 1954; SHERMAN et al., 2019a; SOUSA et al., 2017). Todavia, há grande escassez de estudos com modelos animais para melhor avaliação e caracterização dessas consequências em nível hepático.

A redução do peso corporal final nos grupos diabéticos com ou sem infecção pelo vírus Zika era prevista, uma vez que resultados semelhantes foram previamente encontrados (BAL et al., 2011; GUIMARÃES-ERVILHA et al., 2021; HOU et al., 2022). Isso ocorre, pois a disfunção metabólica da glicose em animais com diabetes afeta negativamente as funções celulares, resultando em redução na síntese de ATP e insulina, o que por sua vez contribui para a perda de peso e desregulação hormonal (KING; LOEKEN, 2004). O aumento do IHS nos grupos Z, D e DZ, junto aos valores elevados de conteúdo de água observados nesses grupos, pode indicar a presença de degeneração hidrópica (DH), conforme descrito no artigo de Sousa et al. (2017). O aumento no volume do fígado nos camundongos dos grupos D e DZ, junto à diminuição da densidade do fígado nesses grupos, sugere a ocorrência de possíveis doenças, como desenvolvimento de esteatose, hiperemia, acúmulo de tecido conjuntivo no fígado ou DH (SOUSA et al., 2017).

O desequilíbrio em favor de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode desencadear um estado denominado de estresse oxidativo (OS). As ROS são subprodutos do metabolismo aeróbico normal, produzidos principalmente em organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e peroxissomos. Concomitante à sua produção, ocorre a ação de agentes antioxidantes para remover eficientemente o excesso de ROS, a fim de manter a homeostase celular e prevenir danos celulares, lesões teciduais e morte celular provocados pelo acúmulo dessas espécies reativas (ROY et al., 2017). A sua produção é estimulada por infecções virais que também podem reduzir os níveis de enzimas antioxidantes. Além disso, a elevação na produção de ROS pode contribuir para a patogênese viral a partir da ativação da resposta inflamatória antiviral das células hospedeiras e por isso foram analisadas neste trabalho (DERAMAUDT; DILL; BONAY, 2013; ZHANG et al., 2019).

A oxidação de proteínas pode ser avaliada através do teor de proteína carbonilada, uma vez que os níveis de grupos de carbonila (aldeídos e cetonas) aumentam durante esse

processo oxidativo causado pelas espécies reativas. Esse aumento nos níveis de proteínas carboniladas encontrado nos três grupos analisados, mais significativamente no grupo Z, indica indiretamente a presença de ROS, que provoca modificações químicas capazes de comprometer a atividade biológica das proteínas devido às suas alterações estruturais (BERLETT; STADTMAN, 1997; CHEVION; BERENSHEIN; STADTMAN, 2000; SHACTER, 2000).

O aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) encontrado nos grupos D e DZ são indicativos indiretos de um quadro de desbalanço redox, que pode levar à morte celular e modular a sinalização redox (IVANOV; BARTOSCH; ISAGULIANTS, 2017), um quadro denominado de estresse nitrosativo. O aumento do MDA também sinaliza um estresse oxidativo, produzido como produto da peroxidação lipídica. Seu aumento foi encontrado nos grupos D e DZ, indicando a presença de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, situação já observada sob condição de diabetes, visto que a hiperglicemia e dislipidemia associadas à doença causa disfunção mitocondrial, favorecendo a formação de ROS, e infecções virais (ABDEL-HAMID et al., 2020; ALMEIDA et al., 2020; ZHANG; RONG; LI, 2019). É importante ressaltar que a elevação do MDA pode ser proporcional à gravidade da doença (PILLAI et al., 2019).

A defesa antioxidante de um organismo é composta por moléculas enzimáticas ou não-enzimáticas que previnem ou removem a oxidação de ROS em uma molécula-alvo. A superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são importantes defesas enzimáticas contra lesões causadas por ROS nas células. A SOD atua catalisando a dismutação do superóxido, uma espécie reativa de oxigênio tóxica produzida pelo metabolismo celular normal, em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, e a CAT atua a partir do peróxido de hidrogênio proveniente da SOD (BARBOSA et al., 2010; CAMINI et al., 2017; ZHANG; RONG; LI, 2019). Os níveis da SOD não se alteraram devido ao diabetes ou à exposição ao ZIKV. No entanto, a atividade CAT mostrou-se elevada no grupo Z. Como é sabido que a produção do H_2O_2 é aumentada sob condições de estímulos inflamatórios, esse aumento pode indicar a ocorrência dessa situação no grupo infectado pelo ZIKV, visto que a CAT atua na defesa antioxidante de primeira linha e é ativada após exaustão da SOD (LIMA et al., 2018).

A GST atua nas reações redox através da conjugação da glutationa aos produtos de oxidação, reduzindo a carga oxidativa nas células. Seu nível foi menor nos grupos Z e DZ, indicando uma menor eficácia na neutralização do estresse oxidativo (KATO; NAITO, 1999). Os níveis totais dos antioxidantes não enzimáticos em amostras

biológicas são aferidos pelo FRAP. A redução de FRAP observada em todos os grupos tratados (Z, D e DZ) demonstra um possível desequilíbrio redox provavelmente por terem sido consumidos, visto que reflete a ausência dos antioxidantes enzimáticos no momento de estresse oxidativo indicado indiretamente pelos parâmetros anteriores (SAMUDI et al., 2009; SALAHSHOOR et al., 2019).

As aminotransferases circulantes em níveis elevados constituem um marcador sensível para a presença de danos em órgãos. A alanina aminotransferase (ALT) é predominantemente localizada no citoplasma das células hepáticas, enquanto a aspartato aminotransferase (AST) é encontrada principalmente nas mitocôndrias de vários órgãos, incluindo fígado, rim e coração. A ocorrência de lesão celular hepática resulta em danos nas membranas celulares dos hepatócitos, o que culmina na liberação dessas enzimas na corrente sanguínea. Portanto, os valores elevados de ALT e AST podem indicar lesões no fígado dos indivíduos pertencentes aos grupos Z, D e DZ (LAZO et al., 2013; HOU et al., 2022).

A associação entre diabetes e disfunção hepática tem sido amplamente documentada. É sugerido que, devido ao papel central do fígado na regulação da homeostase da glicose, a disfunção hepática possa contribuir para o agravamento da resistência hepática à insulina, resultando em estimulação excessiva da gliconeogênese hepática. Por outro lado, a resistência à insulina e o diabetes também podem afetar a função hepática, possivelmente por meio de processos inflamatórios crônicos, alterações imunológicas e regulação direta da lipogênese hepática (SMITH; ADAMS, 2011; BALLESTRI et al., 2016; XIE et al., 2018; DE SILVA et al., 2019).

A elevação da glicemia no grupo diabético (D) pode ser considerada preditiva, uma vez que é esperada uma falha no sistema de regulação normal dos níveis de glicose no sangue devido à inadequação na produção suficiente de insulina, que é o principal regulador da glicemia (BAL et al., 2011; XIE et al., 2018; ABDEL-HAMID et al., 2020; GUIMARÃES-ERVILHA et al., 2021; HOU et al., 2022). No caso dos grupos Z e DZ, embora não haja certeza definitiva, estudos indicam que as alterações imunomediadas no metabolismo sistêmico após a infecção podem ter impacto negativo no controle glicêmico em indivíduos com diabetes (TURK WENSVEEN et al., 2021). Além disso, já foi relatada resistência à insulina em hepatócitos causada por outro flavivírus, o vírus da dengue, em que a indução da secreção do TNF- α regulou negativamente o IRS-1 (substrato do receptor de insulina). Portanto, é possível que haja algum mecanismo em comum, uma vez que ambos os vírus pertencem à mesma família (LIU et al., 2017).

Os níveis de albumina (proteína considerada o principal transportador de ácidos graxos, secretada pelos hepatócitos), foram diminuídos no grupo infectado pelo ZIKV. Sua redução pode ser indicativa de uma síntese hepática prejudicada, consequência esperada quando ocorre alguma lesão mais grave nos hepatócitos, como o desenvolvimento da cirrose com o comprometimento da função hepática, uma vez que a cicatrização do fígado com o depósito de tecido conjuntivo (fibrose) é irreversível e não funcional (ARROYO; FERNANDEZ, 2011; ZACCHERINI; BERNARDI, 2019).

O aumento do colesterol encontrado no grupo Z pode estar relacionado com alguma alteração na expressão de enzimas e proteínas, como HMG-CoA redutase ou NPC1L1, envolvidas no metabolismo do colesterol. Além disso, pode ocorrer desregulação na síntese e secreção de lipoproteínas, como VLDL, que são responsáveis pelo transporte de triglicerídeos e colesterol do fígado para outros tecidos (DO et al., 2009; NAGASHIMA et al., 2015; GUO; LI; YIN, 2018).

A gama-glutamilttransferase (Gama-GT) e a fosfatase alcalina são enzimas expressas em diversos tecidos do organismo dos mamíferos, principalmente na membrana celular das células hepáticas. A elevação dos níveis de Gama-GT nos grupos D e DZ, e fosfatase alcalina no grupo DZ podem ser consideradas marcadores indicativos de lesão hepática, resultante da liberação dessas enzimas de células hepáticas danificadas para a corrente sanguínea após lesão ou morte celular (SILVA et al., 2019). A associação entre diabetes e elevação dos níveis de Gama-GT e da fosfatase alcalina já foi relatada em estudos que analisam a relação entre diabetes e alterações hepáticas com resultados semelhantes (SMITH; ADAMS, 2011; BALLESTRI et al., 2016; DE SILVA et al., 2019; ZHANG; URBAN, 2020; NDREPEPA et al., 2022). A autólise encontrada no grupo Z se deve à ruptura dos lisossomos que expõem enzimas que digerem as células por lesões de processos infecciosos, como constatado por Geokas et al. (1972) em uma análise de hepatite viral ou relacionadas ao efeito do estresse oxidativo que foi encontrado nesta pesquisa e já conhecido na literatura (DIX; GRAHAM, 2000).

O fígado desempenha papel fundamental na metabolização do lactato, convertendo-o em outros metabólitos, incluindo o piruvato, que serve como fonte de energia. Disfunções hepáticas podem levar a alterações no metabolismo do lactato, resultando em sua acumulação no sangue, conhecida como acidose láctica. No presente estudo, observou-se aumento significativo nos níveis de lactato nos grupos Z, D e DZ. Portanto, a capacidade do fígado de metabolizar eficientemente o lactato pode estar

comprometida nesses grupos, contribuindo para o acúmulo desse metabólito e o desenvolvimento da acidose láctica (ZHANG et al., 2022).

A morte celular encontrada na análise morfológica nos grupos com infecção do vírus Zika pode estar associada à atuação dos monócitos não clássicos, como ocorre nas infecções por dengue e febre amarela (PAES et al., 2010; SAKINAH et al., 2017; WIN et al., 2019; BAILEY et al., 2020) que também são flavivírus, produzindo o TNF- α . A indução desses processos de destruição das células pode estar associada à estimulação de uma ampla gama de células de defesa, resultando em resposta imunológica robusta marcada por uma cascata de citocinas que prejudicam os tecidos. A morte celular hepática encontrada no grupo diabético evidencia a associação entre disfunção hepática e diabetes. Estudos anteriores já haviam estabelecido esta relação entre o mau funcionamento do fígado e o diabetes, especialmente em pacientes com diabetes tipo 1 que apresentam falta de insulina. A ausência de insulina contribui para a ativação da enzima G6Pase, resultando em aumento da gliconeogênese e glicogenólise no fígado. Isso pode levar à sobrecarga hepática, acúmulo de infiltrados inflamatórios e ativação de inflamossomas, resultando na secreção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL6, que, por sua vez, contribuem para a morte celular hepática (ABDEL-HAMID et al., 2020; XIE et al., 2018; HOU et al., 2022).

A observação de infiltrados inflamatórios nos três grupos (DZ, D e Z) já era esperado, visto que esse processo infeccioso gera uma inflamação no organismo, então essa infiltração, frequentemente compreendendo células mononucleares (tais como monócitos e macrófagos), é um traço distintivo da inflamação hepática desencadeada por flavivírus (PINHEIRO et al., 2023). Essa invasão celular acarreta no agravamento da viremia, resultando em manifestação mais severa da enfermidade.

O aumento das células mononucleadas nos grupos D e DZ pode indicar a continuidade de um processo de regeneração hepática, visto que ocorre redução dos hepatócitos binucleados devido à sua divisão em mononucleados (MIYAOKA et al., 2012; GERLYNG et al., 1993). A dilatação dos sinusoides encontrada no grupo Zika pode ter ocorrido devido ao efeito dos macrófagos, incluindo as células de Küpffer, que estimulam a liberação de quimiocinas e citocinas a partir da identificação das partículas virais no fígado. Essas substâncias ativam células inflamatórias e funcionam como apresentadoras de antígenos no local. Em outras infecções de flavivírus, como dengue e febre amarela, esse efeito estava relacionado às células TCD8⁺, que secretam citocinas

pró-inflamatórias, desencadeando vasodilatação para promover maior infiltração de células de defesa e causando danos celulares (PINHEIRO et al., 2023).

O aumento dos níveis de glicogênio nos grupos Z e D pode estar relacionado ao efeito citotóxico que o Zika vírus e o diabetes exercem no fígado, visto que isso já foi relatado em infecções virais e diabetes melítus, provavelmente por ocasionar alguma deficiência da enzima glicose-6-fosfatase, como mencionado anteriormente (CAMACHO et al., 2005).

Através de RT-PCR detectamos o RNA viral nos grupos da associação do diabetes com o ZIKV quando esse RNA não era mais presente no grupo que tinha apenas a infecção pelo ZIKV. Durante a infecção viral o sistema imune é alterado de forma transitória no como uma estratégia contra a infecção viral (WENSVEEN et al., 2021). Essa proteção normal contra a infecção é mediada por células imunes especializadas, mas também por habilidades inatas dos tecidos para fornecem barreiras contra patógenos e sinalizam sua infecção ao sistema imunológico (WENSVEEN et al., 2021). No entanto, em pessoas diabéticas, esse sistema falha e prejudica a capacidade de responder adequadamente a infecção em quase todos os níveis de controle, afetando negativamente a resposta imune antiviral (WENSVEEN et al., 2021). Essa manutenção da infecção por tempo prolongado deve-se ao fato de pessoas com quadro de hiperglicemia são menos capazes de eliminar infecções virais (VAN DER POUW KRAAN et al., 2015).

5 CONCLUSÕES

Observamos que tanto a infecção por ZIKV, diabetes ou a sua associação causam danos hepáticos, seja na sua funcionalidade, microestrutura, metabolismo de glicose ou status oxidativo com danos em proteínas e redução da sua atividade antioxidante enzimática ou não enzimática. No entanto, o grupo apenas infectado aos 28 dpi apresenta apenas lesões não específicas ao fígado possivelmente por não estar mais no período ativo da infecção. Os grupos diabéticos e diabéticos com Zika apresentam perfil diferente do grupo apenas infectado pois além dos danos em proteína apresentam um quadro de estresse oxidativo e nitrosativo e apresentam danos hepáticos funcionais específicos. Embora apresentem perfis mais próximos, o grupo diabético com Zika apresenta maior número de alterações que o grupo diabético, no entanto esse agravamento não se deve necessariamente a associação das duas enfermidades, provavelmente o agravamento deve-se ao fato de existirem duas doenças ativas por um longo período causando lesões de forma independente.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, H. A., ABDEL-HAKEEM, E. A., ZENHOM, N. M., e TONI, N. D. M. C-peptide corrects hepatocellular dysfunction in a rat model of type 1 diabetes. *Journal of physiology and biochemistry*, v. 76, n.3, p. 417–425, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00748-y>
- ALMEIDA, L. T. et al. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. *Virus Research*, v. 286, 2020.
- AN, J. et al. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology*, v. 263, n. 1, p. 70–77, 1999.
- ARROYO, V.; FERNANDEZ, J. Pathophysiological basis of albumin use in cirrhosis. *Annals of Hepatology*, v. 10, n. SUPPL. 1, p. S6–S14, 2011.
- BAILEY, A. L. et al. Consumptive coagulopathy of severe yellow fever occurs independently of hepatocellular tropism and massive hepatic injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 51, p. 32648–32656, 2020.
- BAL, R. et al. Protective effects of nanostructures of hydrated C60 fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology*, v. 282, n. 3, p. 69–81, 2011.
- BALLESTRI, S. et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, v. 31, n. 5, p. 936–944, 2016.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARTH, O. M. et al. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 8, p. 905–915, 2006.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 33, p. 20313–20316, 1997.
- BOONPUCKNAVIG, S.; VUTTIVIROJ, O.; BOONPUCKNAVIG, V. Infection of young adult mice with dengue virus type 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 75, n. 5, p. 647–653, 1981.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye-binding. *Anal Biochem*, v. 7, n.72, p. 248–254, 1976.
- BRIANT, L. et al. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology*, v. 464–465, n. 1, p. 26–32, 2014.
- BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, v. 42, n. 5, p. 987–1000, 2005.
- CAMACHO, L. A. et al. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Rev Saude Publica*, v. 39, n. 3, p. 413–420, 2005.
- CAMINI, F. C. et al. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Archives of Virology*, v. 162, n. 4, p. 907–917, 2017.
- CHAN, J. F. W. et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerging Microbes & Infections*, v. 5, 2016.
- CHATEL-CHAIX, L.; BARTENSCHLAGER, R. A monocytic detour to replicate patient-derived hepatitis C virus in hepatoma cells and its use for phenotypic analyses. *Hepatology*, v. 61, n. 4, p. 1112–1114, 2015.
- CHEN, H. C. et al. Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol*, v. 73, n. 3, p. 419–431, 2004.
- CHEVION, M.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E. R. Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research*, v. 33, n. SUPPL., 2000.
- DAEP, C. A.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; EUGENIN, E. A. Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *Journal of NeuroVirology*, v. 20, n. 6, p. 539–560, 2014.
- DE ARAÚJO, T. V. B. et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. March, p. 328–336, 2018.
- DE SILVA, N. M. G. et al. Liver function and risk of type 2 diabetes: Bidirectional mendelian randomization study. *Diabetes*, v. 68, n. 8, p. 1681–1691, 2019.
- DERAMAUDT, T. B.; DILL, C.; BONAY, M. Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. *Medecine et Maladies Infectieuses*, v. 43, n. 3, p. 100–107, 2013.
- DIX, J., GRAHAM, M. **Time of death, decomposition and identification**. Londres: CRC Press; 2000. p. 8–9.

- DO, R. et al. Squalene synthase: A critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. **Clinical Genetics**, v. 75, n. 1, p. 19–29, 2009.
- DUAN, T. et al. Noninvasive imaging of hepatic dysfunction: A state-of-the-art review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 16, p. 1625–1640, 2022.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- EL-BACHA, T. et al. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 10, p. 1158–1166, 2007.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.
- FRANÇA, R. F.; ZUCOLOTO, S.; ANTÔNIO LOPES DA FONSECA, B. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, n. 3, p. 321–326, 2010.
- GEERLING, E. et al. Current flavivirus research important for vaccine development. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 1–5, 2020.
- GERLYNG, P., ABYHOLM, A., GROTMOL, T., ERIKSTEIN, B., HUITFELDT, H. S., STOKKE, T., e SEGLEN, P. O. Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. **Cell proliferation**, v. 26, n. 6, p. 557–565, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1993.tb00033.x>
- GEOKAS, M C et al. The association of viral hepatitis and acute pancreatitis. **California medicine** v. 117, n. 3, p.1-7, 1972.
- GOODFELLOW, F. T. et al. Zika virus induced mortality and microcephaly in chicken embryos. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 22, p. 1691–1697, 2016.
- GUIMARÃES-ERVILHA, L. O. et al. Green Tea Infusion Ameliorates Histological Damages in Testis and Epididymis of Diabetic Rats. **Microscopy and Microanalysis**, v. 27, n. 5, p. 1133–1145, 2021.
- GUO, S.; LI, L.; YIN, H. Cholesterol Homeostasis and Liver X Receptor (LXR) in Atherosclerosis. **Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets**, v. 18, p. 27–33, 2018.
- HICKMAN, I. J. et al. In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: Implications for therapy. **Journal of Hepatology**, v. 39, n. 6, p. 1042–1048, 2003.

- HICKMAN, I. J.; MACDONALD, G. A. Impact of Diabetes on the Severity of Liver Disease. **American Journal of Medicine**, v. 120, n. 10, p. 829–834, 2007.
- HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
- HOTTA, H. et al. Inoculation of dengue virus into nude mice. **Journal of General Virology**, v. 52, n. 1, p. 71–76, 1981.
- HOU, Y. et al. Adipose-derived stem cells alleviate liver injury induced by type 1 diabetes mellitus by inhibiting mitochondrial stress and attenuating inflammation. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2022.
- HUI, J. M. et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 420–427, 2003.
- IVANOV, A. V.; BARTOSCH, B.; ISAGULIANTS, M. G. Oxidative stress in infection and consequent disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 10–13, 2017.
- KATO, S.; NAITO, Z. Glutathione S-transferase. *Nippon rinsho*. **Japanese journal of clinical medicine**, v. 57, n. 22, p. 451–453, 1999.
- KING, G. L.; LOEKEN, M. R. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 4, p. 333–338, 2004.
- KUMAR, V. Robbins Patologia Básica. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2018.
- KUO, C, TAI, D, CHANG-CHIEN, C. et al. Liver Biochemical Tests and Dengue Fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 3, p. 265-270, 1992. doi: 10.4269/ajtmh.1992.47.265
- KUROSAKI, M. et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing hepatocellular carcinoma independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy. **Hepatology Research**, v. 40, n. 9, p. 870–877, 2010.
- LAZO, M. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: The third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 1, p. 38–45, 2013.
- LEOW, S. M., CHUA, S. X., VENKATACHALAM, G., SHEN, L., LUO, L., & CLEMENT, M. V. Sub-lethal oxidative stress induces lysosome biogenesis via a lysosomal membrane permeabilization-cathepsin-caspase 3-transcription factor EB-dependent pathway. **Oncotarget**, V.8, n.10, p.16170–16189, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14016>

- LIMA, G. D. DE A. et al. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 78, p. 130–140, 2018.
- LIU, L. et al. Analysis and prediction of drug–drug interaction by minimum redundancy maximum relevance and incremental feature selection. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 35, n. 2, p. 312–329, 2017.
- LIU, X. et al. Dengue virus is involved in insulin resistance via the downregulation of IRS-1 by inducing TNF- α secretion. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1868, n. 10, 2022.
- MACNAMARA, F.N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1).
- MADHU, S. V. et al. Atorvastatin prevents type 2 diabetes mellitus - An experimental study. **European Journal of Pharmacology**, v. 728, n. 1, p. 135–140, 2014.
- MANSO, P. P. D. et al. Kinetic Study of Yellow Fever 17DD Viral Infection in Gallus gallus domesticus Embryos. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.
- MCARTHUR, M. A.; XIAO, S. Y.; BARRETT, A. D. T. Phenotypic and molecular characterization of a non-lethal, hamster-viscerotropic strain of yellow fever virus. **Virus Research**, v. 110, n. 1–2, p. 65–71, 2005.
- METHLEY, A. M. et al. PICO, PICOS and SPIDER: A comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. **BMC Health Services Research**, v. 14, n. 1, 2014.
- NASSIR, F. et al. <Nassir1.pdf>. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 167–175, 2015.
- MIYAOKA, Y., e MIYAJIMA, A. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. **Cell division**, v. 8, n.1, p. 8, 2013. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-8-8>
- MIYAOKA, Y., EBATO, K., KATO, H., ARAKAWA, S., SHIMIZU, S., e MIYAJIMA, A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. **Current biology: CB**, v. 22, n.13, p. 1166–1175, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.016>
- NAGASHIMA, S. et al. Plasma cholesterol-lowering and transient liver dysfunction in mice lacking squalene synthase in the liver. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 5, p. 998–1005, 2015.

- NDREPEPA, G. et al. Alkaline phosphatase and prognosis in patients with diabetes mellitus and ischemic heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 533, n. May, p. 1–7, 2022.
- NDUMELE, C.E. et al. Hepatic steatosis, obesity, and the metabolic syndrome are independently and additively associated with increased systemic inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 8 p. 1927-1932, 2011. doi:10.1161/ATVBAHA.111.228262.
- PAES, M. V. et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. **Laboratory Investigation**, v. 89, n. 10, p. 1140–1151, 2009.
- PAES, M. V. et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. **Virology**, v. 338, n. 2, p. 236–246, 2005.
- PAIXÃO, E. S. et al. Dengue during pregnancy and adverse fetal outcomes: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 857–865, 2016.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. **The continued emerging threat of flaviviruses**. [s.l: s.n.]. v. 176
- PIERSON, T. C.; KIELIAN, M. Flaviviruses: Braking the entering. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 1, p. 3–12, 2013.
- PILLAI, A. B. et al. Oxidative stress response in the pathogenesis of dengue virus virulence, disease prognosis and therapeutics: an update. **Archives of Virology**, v. 164, n. 12, p. 2895–2908, 2019.
- PINHEIRO, B. S. S., RODRIGUES, J. G., DIAS, F. C. R., GOMES, A.O., GOMES, M.L.M. Hepatic damage caused by flaviviruses: A systematic review. **Life sciences**, v. 331, n.122074, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122074>
- RATZIU, V.; TRABUT, J. B.; POYNARD, T. Fat, diabetes, and liver injury in chronic hepatitis C. **Current Gastroenterology Reports**, v. 6, n. 1, p. 22–29, 2004.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.
- RODHAIN, F. Yellow fever: A brief history of a tropical Virosis. **Presse Medicale**, v. 51, n. 3, p. 104132, 2022.
- ROY, J. et al. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. **FASEB Journal**, v. 31, n. 9, p. 3729–3745, 2017.

- SAKINAH, S. et al. Impact of dengue virus (serotype DENV-2) infection on liver of BALB/c mice: A histopathological analysis. **Tissue and Cell**, v. 49, n. 1, p. 86–94, 2017.
- SALAHSHOOR, M. R. et al. Effect of *Falcaria vulgaris* on oxidative damage of liver in diabetic rats. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 18, n. 1, p. 15–23, 2019.
- SALVADOR, F. S.; FUJITA, D. M. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 1, p. 49–51, 2016.
- SAMANTA, J. Dengue and its effects on liver. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 2, p. 125, 2015.
- SAMSA, M. M. et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.
- SAMUDI, C. et al. Attenuation of hydrogen peroxide and ferric reducing/antioxidant power serum levels in colorectal cancer patients with intestinal parasitic infection. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 2, p. 15–20, 2009.
- SARBAN, S. et al. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 981–986, 2005.
- SCHUL, W. et al. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 5, p. 665–674, 2007.
- SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32, n. 3–4, p. 307–326, 2000.
- SHARMA, S.; JAIN, S.; RAJARAM, S. Spectrum of Maternofetal Outcomes during Dengue Infection in Pregnancy: An Insight. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2016, p. 10–13, 2016.
- SHASTRI, A. A. et al. Dietary alterations modulate the microRNA 29/30 and IGF-1/AKT signaling axis in breast Cancer liver metastasis. **Nutrition and Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2020.
- SHERMAN, K. E. et al. Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0214016, 2019.

- SHRESTA, S. et al. Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. **Journal of Virology**, v. 80, n. 20, p. 10208–10217, 2006.
- SMITH, B. W.; ADAMS, L. A. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 8, p. 456–465, 2011.
- SOUSA, A. Q. et al. Postmortem Findings for 7 Neonates with Congenital Zika Virus Infection. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 7, p. 1164–1167, 2017.
- SUNG, J. M.; LEE, C. K.; WU-HSIEH, B. A. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e46292, 2012.
- TAN, G. K. et al. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. 1–10, 2010.
- TAN, G. K. X. et al. Subcutaneous infection with non-mouse adapted dengue virus D2Y98P strain induces systemic vascular leakage in AG129 mice. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v. 40, n. 12, p. 523–532, 2011.
- TAURA, N. et al. Association between liver fibrosis and insulin sensitivity in chronic hepatitis C patients. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 12, p. 2752–2759, 2006.
- TOMITA, Y., NIHIRA, M., OHNO, Y., e SATO, S. (2004). Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. **Legal medicine (Tokyo, Japan)**, v. 6, n.1, p. 25–31, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2003.09.001>
- WENSVEEN, T. et al. Type 2 diabetes and viral infection; cause and effect of disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 172, p. 1–13, 2021.
- VAN LEUR, S. W. et al. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2814–2838, 2021.
- WALLIN B, ROSENGREN B, SHERTZER HG, CAMEJO G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Anal Biochem**, v. 208 n.1, p.10-5, 1993. doi: 10.1006/abio.1993.1002.
- WIN, M. M. et al. Ultrastructural Features of Human Liver Specimens from Patients Who Died of Dengue Hemorrhagic Fever. **Trop Med Infect Dis**, v. 4, n. 2, 2019.

World Health Organization. (1986). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.

WU, Y. et al. A unique case of human Zika virus infection in association with severe liver injury and coagulation disorders. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

XIAO, S. Y. et al. Alteration of clinical outcome and histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model by previous infection with heterologous flaviviruses.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 68, n. 6, p. 695–703, 2003.

XIE, Y., SONG, T., HUO, M., ZHANG, Y., ZHANG, Y. Y., MA, Z. H., WANG, N., ZHANG, J. P., & CHU, L. Fasudil alleviates hepatic fibrosis in type 1 diabetic rats: involvement of the inflammation and RhoA/ROCK pathway. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 17, p. 5665–5677, 2018. https://doi.org/10.26355/eurrev_201809_15834

YOON, J. H. et al. Simultaneous evaluation of perfusion and morphology using GRASP MRI in hepatic fibrosis. **European Radiology**, v. 32, n. 1, p. 34–45, 2022.

ZACCHERINI, G.; BERNARDI, M. The role and indications of albumin in advanced liver disease. **Acta Gastro-Enterologica Belgica**, v. 82, n. 2, p. 301–308, 2019.

ZELLWEGER, R. M.; PRESTWOOD, T. R.; SHRESTA, S. Antibodies enhance infection of LSECs in a model of ADE-induced severe dengue disease. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 2, p. 128–139, 2010.

ZHANG, L. et al. Infectivity of Zika virus on primary cells support tree shrew as animal model. **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 232–241, 2019.

ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J**, v. 22, n. 11, 2003.

ZHANG, Z. et al. Zika virus induced more severe inflammatory response than dengue virus in chicken embryonic livers. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–9, 2019.

ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y. P. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

ZHANG, Z.; URBAN, S. Interplay between hepatitis d virus and the interferon response. **Viruses**, v. 12, n. 11, 2020.

Tabela Suplementar 1: Comparação entre o grupo controle não infectado e não diabético com um grupo imunossuprimido (apenas recebeu a dexametasona)

	Controle	Imunossuprimido	p
Peso inicial	26,478 ± 1,608	25,678 ± 1,593	0,98
Peso final	30,667 ± 1,506	30,000 ± 1,549	0,95
Ganho de peso	4,188 ± 2,875	4,322 ± 1,817	0,34
Peso fígado	1,395 ± 0,127	1,363 ± 0,113	0,79
IHS	4,556 ± 0,441	4,562 ± 0,530	0,70
%água	31,976 ± 3,296	31,016 ± 4,070	0,65
Densidade	0,962 ± 0,083	0,920 ± 0,253	0,03
Volume fígado	1,455 ± 0,135	1,470 ± 0,119	0,78
Albumina	2,450 ± 0,335	2,490 ± 0,205	0,31
TGP	10,704 ± 0,878	10,797 ± 0,167	0,002
TGO	3,398 ± 0,310	3,449 ± 0,313	0,985
Colesterol	90,609 3,516	102,605 ± 17,513	0,003
Glicose	145,587 ± 5,008	145,233 ± 2,029	0,07
Lactato	6,779 ± 0,296	6,974 ± 0,303	0,96
Gama GT	13,818 ± 1,568	15,572 ± 2,475	0,34
ALP	386,766 ± 19,300	339,498 ± 64,978	0,02
LDH	1198,509 ± 72,667	973,183 ± 428,212	0,001
SOD	281,368 ± 66,947	292,240 ± 40,913	0,30
CAT	3916,231 ± 998,119	4523,06 ± 1350,35	0,52
GST	7517,07 ± 1886,85	7083,56 ± 1060,28	0,23
FRAP	2,501 ± 0,271	2,545 ± 0,110	0,07
NO	12,670 ± 1,523	12,187 ± 3,064	0,15
MDA	0,054 ± 0,007	0,048 ± 0,006	0,69
PCN	2,414 ± 0,213	2,553 ± 0,230	0,87
Glicogênio	4,418 ± 0,600	4,881 ± 0,258	0,09

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1

Aprovação comitê de ética. (CEUA-76/2020)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 16 de dezembro de 2020

Ofício nº 77/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Luiz Carlos Alves**
 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
 processo nº0076/2020

Certificamos que a proposta intitulada **“A infertilidade masculina causada pelo zikv é acentuada pelo diabetes mellitus?”**, registrado com o nº0076/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Luiz Carlos Alves** Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 15/12/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2021 à 01/12/2025
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogêneo
Nº de animais	200
Peso/Idade	60 dias/ 30-40 gramas
Sexo	(200) Macho
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Instituto Aggeu Magalhães de Pernambuco
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 -Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

7.2 Artigo publicado

Life Sciences 331 (2023) 122074

Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

ELSEVIER

Review article

Hepatic damage caused by flaviviruses: A systematic review

Bruna Santana Silva Pinheiro^a, Julia Gonçalves Rodrigues^a, Fernanda Carolina Ribeiro Dias^{a,b}, Angelica de Oliveira Gomes^a, Marcos de Lucca Moreira Gomes^{b,*}

^a Laboratory of Cell Interactions, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil
^b Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Liver disease
 Flavivirus
 Arbovirus
 Liver necrosis
 Liver pathophysiology
 Hepatocyte

ABSTRACT

Flaviviruses infect arthropods and mammals and their pathologies are a considerable global health problem, affecting about 400 million people per year. The symptoms of these flaviviruses range from mild manifestations such as nausea, vomiting, and headache to more serious cases such as hemorrhage, meningitis, microcephaly, kidney, and liver failure. This review aims to compile the morphological changes that occur due to infections caused by dengue, yellow fever, and Zika viruses, as well as to describe possible mechanisms of action of such flaviviruses in the liver. PRISMA guidelines were used to search for studies associating flavivirus with liver disorders. Two independent reviewers selected the studies on PubMed/Medline, Web of Science, and Scopus search platforms. The SYRCL software was used for the evaluation of the study's quality. Eighteen experimental articles were included. The experimental animals often used in experiments were monkeys (5%), hamsters (10%), chicken embryos (10%), and mice (75%). It is evident that there is a strong hepatic interaction with flaviviruses, and the main hepatic alterations found were steatosis, apoptosis, necrosis, hemorrhage, elevation of ALT and AST levels, and total bilirubin. Flavivirus infection, in general, trigger an upregulation of pro-inflammatory cytokines, leading to structural changes in mitochondria that activate cascades of cellular death and promote insulin resistance. The majority of the studies primarily focus on dengue and yellow fever viruses, while the findings related to Zika virus exposure are still relatively limited and require further investigation.